

FERNANDA CARDOSO FARIAS

CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS  
PÉCTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção de título de Mestre em Bioquímica,  
no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. David Alexander Mitchell  
Co-orientadores: Profa. Nadia Krieger e Prof.  
Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Farias, Fernanda Cardoso  
Caracterização da degradação enzimática de substratos pécnicos. /  
Fernanda Cardoso Farias. – Curitiba, 2014.  
90 f.: il. ; 30cm.

Orientador: David Alexander Mitchell  
Co-orientador: Nadia Krieger  
Co-orientador: Miguel Daniel Nosedá

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Pectinase I. Título II. Mitchell, David Alexander III. Krieger, Nadia  
IV. Nosedá, Miguel Daniel V. Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192482

## TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDA CARDOSO FARIAS

### CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências – Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. David Alexander Mitchell (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)



Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Departamento de Farmácia (UFPR)



Prof. Dr. Marcelo Müller-Santos

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)

Curitiba, 20 de fevereiro de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Fatima e Mario, por todo o afeto e carinho ao longo dos anos, pelos conselhos e compreensão em todos os momentos da minha vida. Agradeço também a minha irmã, Marina, por todos os filmes e séries ridículas a que assistimos juntas, as nossas piadas internas e a toda minha família que sempre me apoiou.

Ao meu orientador, David Mitchell, pelo conhecimento transmitido e a paciência em me orientar ao longo do mestrado. Também aos meus co-orientadores, Miguel Nosedá e Nadia Krieger, pela orientação, pelas sugestões e aprendizado ao longo destes dois anos.

Ao meu namorado, Henrique, que sempre me apoiou, e sem o qual eu não conseguiria manter minha sanidade até aqui, por todo o seu carinho, compreensão e brasagens de cerveja. E à minha sogrinha, Ade, por aguentar meu choro e me alimentar sempre.

Aos meus amigos pela sua disposição em almoçar, jantar, fofocar, reclamar da vida, fazer planos e dar gargalhadas. Muito obrigada Elisa por todos esses anos em que crescemos juntas, obrigada Ana Amélia, Bruno, Caroline, Flávia, Izabela e Joice por me compreenderem sempre.

Aos amigos e colegas que me ajudaram nesta etapa da vida, principalmente ao pessoal dos grupos de pesquisas em pectinases, modelagem e lipases por todos os cafés, almoços, jantares, momentos de descontração no dia a dia e força para concluir o trabalho.

Especialmente à Maura, que está todos os dias ao meu lado escutando minhas reclamações e me ajudando, mesmo além do que deveria.

Às alunas do professor Miguel que me ajudaram a entender um pouco os carboidratos, obrigada Jenifer e Ester.

Aos professores Marcelo Müller e Alan Guilherme Gonçalves, que compuseram a banca examinadora.

Ao programa de pós-graduação pela oportunidade concedida e às agências CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“So Long, and Thanks for All the Fish”

Douglas Adams

## RESUMO

A degradação enzimática da pectina em oligossacarídeos e em ácido D-galacturônico é uma etapa importante em uma biorrefinaria baseada no uso de polpa cítrica. Alguns oligossacarídeos gerados possuem atividade biológica, enquanto o ácido D-galacturônico pode ser posteriormente convertido em várias moléculas com aplicações, incluindo agentes acidificantes, surfactantes, ácido ascórbico e bioplástico. Uma das limitações da degradação enzimática da pectina é a lentidão do processo, que se deve a dois fenômenos. Primeiro, a lentidão é atribuída ao fato de várias das enzimas envolvidas sofrerem inibição pelo produto final, ácido D-galacturônico. Segundo, ocorre uma desaceleração significativa nos primeiros minutos da reação, que, até o momento, não foi explicada. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a degradação enzimática de substratos pécticos, a fim de determinar a causa desta desaceleração inicial. Inicialmente, foram calculados os valores aparentes do parâmetro  $K_{M*}$  da equação de Michaelis-Menten, para os substratos pectina e ácido poligalacturônico. Para o complexo de pectinases da Sigma-Aldrich, os valores de  $K_{M*}$  foram 1,4 e 0,8 g L<sup>-1</sup>, para a pectina e o ácido poligalacturônico, respectivamente. Para o Pectinex Ultra SPL da Novozymes, os valores de  $K_{M*}$  foram 2,7 e 0,1 g L<sup>-1</sup>, para a pectina e o ácido poligalacturônico, respectivamente. Em relação aos valores reportados na literatura, os valores obtidos para  $K_{M*}$  são bem próximos. Após isso, a degradação de diferentes substratos pécticos foi caracterizada, com atenção ao início da reação. Com base na literatura sobre a degradação de outros polissacarídeos, foram levantadas quatro possibilidades para explicar a desaceleração no início da reação: inativação térmica das enzimas, inibição pelo ácido D-galacturônico, estagnação das enzimas em certas regiões do substrato e depleção rápida do substrato disponível. Nenhuma destas hipóteses foi capaz de explicar a desaceleração inicial. Contudo, ao analisar a distribuição dos tamanhos dos oligossacarídeos formados ao longo da reação, foi levantada a hipótese que a reação ocorre em duas etapas distintas. Na primeira etapa, que corresponde os primeiros 5 a 10 minutos de reação, predomina a quebra das moléculas de pectina em oligossacarídeos pela ação das endoenzimas. Com a exaustão das cadeias de pectina, ocorre uma desaceleração significativa. Segue-se, então, a segunda etapa, na qual os oligossacarídeos são degradados lentamente pelas exoenzimas e enzimas auxiliares. Com base nesta hipótese, foi proposto um modelo matemático simplificado, que conseguiu descrever, qualitativamente, os perfis obtidos experimentalmente para a liberação de ácido D-galacturônico e açúcares redutores.

Palavras-chave: Pectinases, Cinética enzimática, Degradação de carboidratos, Biorrefinaria, Ácido D-galacturônico.

## ABSTRACT

The enzymatic degradation of pectin to obtain oligosaccharides and D-galacturonic acid will be an important step in a future citrus-waste biorefineries. Some oligosaccharides derived from pectin have biological activity, whereas the D-galacturonic acid can then be converted into molecules with various applications, including acidifying agents, surfactants, ascorbic acid and bioplastic. An important limitation of the enzymatic degradation of pectin is the slowness of the process, which is due to two factors. Firstly, the slowness has been attributed to the product inhibition, by D-galacturonic acid, which affects several of the enzymes involved. Secondly, there is a significant deceleration during the first few minutes of the reaction, a phenomenon that has not yet been explained. The aim of this study was to characterize the enzymatic degradation of pectic substrates, in order to determine the cause of this initial deceleration. Initially, apparent values were determined for the parameter  $K_{M*}$  of the Michaelis-Menten equation, for pectin and polygalacturonic acid as substrates. For the pectinase complex of Sigma-Aldrich, the values of  $K_{M*}$  were 1.4 and 0.8 g L<sup>-1</sup>, for pectin and polygalacturonic acid, respectively. For Pectinex Ultra SPL of Novozymes, the values of  $K_{M*}$  were 2.7 and 0.1 g L<sup>-1</sup>, for pectin and polygalacturonic acid, respectively. In comparison to values that have been reported in the literature, the values obtained for  $K_{M*}$  were similar. The degradation of different pectic substrates was then characterized, with a focus on the beginning of the reaction. Based on the literature regarding the degradation of other polysaccharides, four hypotheses that might explain the initial deceleration were tested: thermal inactivation of enzymes, product inhibition, stalling of enzymes in certain regions of the substrate and rapid depletion of available substrate. None of these hypotheses was able to explain the initial deceleration. However, analysis of the size distribution of the oligosaccharides formed during the reaction led to the proposal of the hypothesis that there are two distinct phases during the reaction. In the first phase, which corresponds to the first 5 to 10 minutes of the reaction, the predominant process is the conversion of the pectin molecules to oligosaccharides by the endoenzymes. The initial deceleration corresponds to the exhaustion of the pectin chains. The second phase follows, with the slow degradation of the oligosaccharides by exoenzymes and auxiliary enzymes. Based on this hypothesis, a simplified mathematical model was proposed. This model was able to describe, qualitatively, the experimental profiles obtained for reducing sugars and D-galacturonic acid.

Key-words: Pectinases, Enzyme kinetics, Polymer degradation, Biorefinery, D-galacturonic acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - BIORREFINARIA COM USO INTEGRADO DE POLPA CÍTRICA .....	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA HOMOPOLIGALACTURONANA. ....	22
FIGURA 3 - SUBESTRUTURAS DA PECTINA.....	23
FIGURA 4 - ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA A PECTINA.....	24
FIGURA 5 - MODO DE AÇÃO DAS HIDROLASES E LIASES EM UMA MOLÉCULA DE PECTINA. ....	27
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DOS SUBSÍTIOS NO SÍTIO ATIVO DE UMA ENDOPOLIGALACTURONASE.....	28
FIGURA 7 - AÇÃO DE DIVERSAS ENZIMAS NA ESTRUTURA DA PECTINA .....	29
FIGURA 8 - REATOR ENCAMISADO DE REAÇÃO ENZIMÁTICA. ....	41
FIGURA 9 - GRÁFICO DE HANES-WOOLF PARA A OS VALORES ENCONTRADOS DE $v_0$ .....	45
FIGURA 10 - PERFIS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS EM ATÉ 37 MIN. ....	48
FIGURA 11 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO EM 40 MIN.....	51
FIGURA 12 - PERFIS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS EM 72 H. ....	53
FIGURA 13 - ESTABILIDADE À TEMPERATURA DE ENSAIO, 30°C. ....	55
FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PRODUTO AO INÍCIO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO A. ....	57
FIGURA 15 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PRODUTO AO INÍCIO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO N. ....	58
FIGURA 16 - DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA ISOLADA POR DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO N. ....	60
FIGURA 17 - VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE PONTAS REDUTORAS DURANTE A DEGRADAÇÃO DE PECTINA CÍTRICA ISOLADA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO ENZIMÁTICO .....	61
FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO LIBERADO RELACIONADO A CONCENTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.....	62
FIGURA 19 - DEGRADAÇÃO DE PECTINA CÍTRICA ISOLADA, COM SEGUNDA APLICAÇÃO DE ENZIMAS. ....	64
FIGURA 20 - VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE PONTAS REDUTORAS NA DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA ISOLADA, COM SEGUNDA APLICAÇÃO DE ENZIMAS.....	65
FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE OLIGÔMEROS GERADOS AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO .....	67



FIGURA 22 - HIPÓTESE SOBRE O MODO DE AÇÃO DAS PECTINASES NA PECTINA.....	70
FIGURA 23 - IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DESCRITAS NO MODELO DESCRITIVO PARA A DEGRADAÇÃO DA PECTINA PELO COMPLEXO A. 71	
FIGURA 24 - ESQUEMA DO MODELO MATEMÁTICO PROPOSTO.....	73
FIGURA 25 - PERFIS PREVISTOS PELO MODELO PARA A HIDRÓLISE DE ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO.....	76
FIGURA 26 - PERFIL EXPERIMENTAL DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO.....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE PECTINA EM % (m/m) .....	21
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS MAIS COMUNS .....	30
TABELA 3 - PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN.....	46
TABELA 4 - VELOCIDADES DE DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA E ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO NO INÍCIO DA REAÇÃO E APÓS 20 MINUTOS DE REAÇÃO.....	50
TABELA 5 - VALORES AJUSTADOS AOS PARÂMETROS DO MODELO DESENVOLVIDO .....	76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AG-I	–	Arabinogalactana
Api	–	Apiose
Ara	–	Arabinose
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNS	–	Ácido 3,5-dinitrosalisílico
FAOSTAT	–	The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDCA	–	Ácido 2,5-furanodicarboxílico
Fuc	–	Fucose
GalA	–	Ácido D-galacturônico
Gal	–	Galactose
HG	–	Homogalacturonana
HPSEC	–	Cromatografia de Exclusão molecular de Alta Eficiência
IR	–	Detector de Índice de Refração
LTFE	–	Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática
NREL	–	National Renewable Energy Laboratory
PET	–	Politereftalato de etileno
RG-I	–	Ramnogalacturonana I
RG-II	–	Ramnogalacturonana II
Rha	–	Ramnose
U	–	Atividade enzimática
XG	–	Xilogalacturonana
Xyl	–	Xilose

## LISTA DE SÍMBOLOS

$B$	– Polímero com 100 unidades de ácido D-galacturônico.
$[B]$	– Concentração de polímeros.
$M$	– Oligômero de tamanho intermediário.
$[M]$	– Concentração de oligômeros de tamanho intermediário.
$P$	– Produto, ácido D-galacturônico.
$[P]$	– Concentração de produto.
$[R]$	– Concentração de pontas redutoras.
$S$	– Oligômero de tamanho pequeno.
$[S]$	– Concentração de oligômeros de tamanho pequeno.
$E_1$	– Enzima endopoligalacturonase.
$E_2$	– Enzima exopoligalacturonase.
$N1$	– Número de oligômeros de tamanho intermediário formados por ciclo.
$N2$	– Número de oligômeros de tamanho pequeno formados por ciclo.
$N3$	– Número de produtos formados por ciclo.
$S_0$	– Concentração inicial de substrato.
$v_0$	– Velocidade inicial de reação.
$v_{20}$	– Velocidade em 20 min de reação.
$k_{cat}$	– Número de <i>turnover</i> (quanto substrato pode ser convertido a produto em um segundo).
$K_M$	– Constante de dissociação do substrato.
$K_{MB}$	– Constante de dissociação do polímero para as endopoligalacturonases.
$K_{MM}$	– Constante de dissociação do oligômeros de tamanho intermediário para as endopoligalacturonases.
$K_{MP}$	– Constante de dissociação do produto para as exopoligalacturonases.
$K_{MS}$	– Constante de dissociação do oligômeros pequenos para as exopoligalacturonases.
$V_{m\acute{a}x}$	– Velocidade inicial máxima de reação.
$V_{m\acute{a}x1}$	– Velocidade inicial máxima de conversão de polímeros a oligômeros

de tamanho intermediário.

$V_{m\acute{a}x2}$  – Velocidade inicial máxima de conversão de oligômeros de tamanho intermediário a oligômeros pequenos.

$V_{m\acute{a}x3}$  – Velocidade inicial máxima de conversão de oligômeros pequenos a produto.

$\frac{k_{cat}}{K_M}$  – Eficiência catalítica.

$\frac{d[B]}{dt}$  – Velocidade de variação dos polímeros.

$\frac{d[M]}{dt}$  – Velocidade de variação dos oligômeros de tamanho intermediário.

$\frac{d[P]}{dt}$  – Velocidade de formação de produto.

$\frac{d[R]}{dt}$  – Velocidade de variação de pontas redutoras.

$\frac{d[S]}{dt}$  – Velocidade de variação dos oligômeros de tamanho pequeno.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1. O POTENCIAL DAS BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA NO BRASIL. ....	18
2.2. A PECTINA CÍTRICA E OS PRODUTOS DE SUA DEGRADAÇÃO .....	21
2.2.1. Estrutura da pectina.....	21
2.2.2. Produtos da degradação da pectina .....	24
2.3. OBTENÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO A PARTIR DE SUBSTRATOS PÉCTICOS.....	25
2.4. AS ENZIMAS UTILIZADAS NA SACARIFICAÇÃO DA PECTINA .....	26
2.5. A CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS E OUTROS CARBOIDRATOS.....	31
2.5.1. Caracterização da degradação de substratos pécticos .....	31
2.5.2. Caracterização da degradação de outros polissacarídeos .....	32
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. REAGENTES E MATERIAIS .....	36
4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	37
4.2.1. Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS.....	37
4.2.2. Determinação de estabilidade da atividade dos complexos a temperatura de ensaio .....	37
4.2.3. Quantificação de ácido D-galacturônico .....	38
4.2.4. Quantificação de proteínas .....	38
4.2.5. Distribuição de tamanho dos oligômeros.....	38
4.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	39
4.3.1. Ensaios para a determinação de velocidade inicial de reação .....	39
4.3.2. Ensaios realizados em reator encamisado .....	40
4.3.3. Ensaios realizados em erlenmeyers .....	41
4.4. SIMULAÇÕES E TRATAMENTO DOS DADOS OBTIDOS.....	42
4.4.1. Simulação do Modelo matemático desenvolvido .....	42
4.4.2. Determinação da velocidade de reação ao longo do ensaio .....	42

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS .....	44
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS POR COMPLEXOS DE PECTINASES .....	47
5.2.1. Caracterização do início da reação de degradação enzimática de substratos pécticos .....	47
5.2.2. Caracterização da degradação enzimática de substratos pécticos em tempos prolongados .....	52
5.3. IDENTIFICAÇÃO DA CAUSA PARA A DESACELERAÇÃO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO .....	54
5.3.1. Grau de desnaturação térmica ao longo da reação .....	54
5.3.2. Caracterização da inibição das hidrolases nos complexos de pectinases pelo produto .....	55
5.3.3. Efeito do aumento da concentração inicial de enzimas .....	59
5.3.4. Efeito de nova adição de enzima após a estabilização da velocidade de reação.. .....	62
5.3.5. Caracterização de oligossacarídeos formados ao longo da reação ....	66
5.4. MODELO DESCRITIVO DA DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS POR COMPLEXOS DE PECTINASES .....	68
5.5. MODELO MATEMÁTICO SIMPLIFICADO DA DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS PELOS COMPLEXOS DE PECTINASES .....	72
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	78
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

A degradação de substratos pécticos será um passo muito importante dentro de uma futura biorrefinaria de polpa cítrica. Essa biorrefinaria utilizará cascas e bagaço de laranja para a obtenção de vários produtos, incluindo a pectina e os produtos de sua degradação, oligossacarídeos e o ácido D-galacturônico.

Alguns dos oligossacarídeos obtidos pela despolimerização da pectina possuem atividade biológica como prébioticos, agentes antibacterianos, antioxidantes e anticancerígenos (YAMAGUCHI *et al.*, 1994; OLANO-MARTIN *et al.*, 2002; RASTALL *et al.*, 2005), portanto, podem ser aplicados na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica (HOLCK *et al.*, 2011). O ácido D-galacturônico, por sua vez, é uma molécula precursora de acidulantes, surfactantes, ácido ascórbico e bioplástico (WERPY e PETERSEN, 2004; RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA *et al.*, 2010). Desta forma, o ácido D-galacturônico é uma molécula interessante em muitos ramos de indústria.

Para que sejam obtidos os oligossacarídeos e o ácido D-galacturônico, a reação de despolimerização da pectina cítrica deve ser eficiente e ter baixo custo. Esta despolimerização pode ser feita por meio de hidrólise ácida ou degradação enzimática. A hidrólise ácida é pouco eficiente na quebra de ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido D-galacturônico presentes na pectina (GROHMANN, CAMERON e BUSLIG, 1995) e, por necessitar de temperaturas extremas e longos tempos de reação, pode degradar os produtos formados ao longo da reação (BLAKE e RICHARDS, 1968). A via enzimática, por sua vez, é mais eficiente, por ser específica na quebra das ligações glicosídicas dentro da pectina, e também por não destruir os produtos liberados na reação.

O processo enzimático de degradação depende das pectinases, um grupo de enzimas com diferentes atividades que atuam em conjunto para degradar totalmente os substratos pécticos (ANDERSEN *et al.*, 2012). Dentro deste grupo, algumas enzimas atuam na subestrutura de homopoligalacturonana, ou seja, a região composta de resíduos de ácido D-galacturônico, enquanto outras atuam em subestruturas com diversos açúcares ou removem ligações éster presentes na homopoligalacturonana. O modo



como essas enzimas atuam também é diversificado. Algumas enzimas catalisam somente uma reação de despolimerização para cada encontro com o substrato, enquanto outras são processivas, catalisando diversas reações ao encontrarem seu substrato. Além disso, algumas enzimas no complexo de pectinases sofrem com a inibição pelo principal produto da degradação, o ácido D-galacturônico (BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; MERTENS, 2013).

Apesar de a via enzimática ser uma boa estratégia para a degradação de substratos pécticos, a reação é muito lenta. Esta lentidão foi atribuída à inibição pelo ácido D-galacturônico (BACIU e JÖRDENING, 2004; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; KHAMSEH e MICCIO, 2011). No entanto, a inibição pelo ácido D-galacturônico foi abordada somente de maneira superficial na literatura e não se pode afirmar que é a única causa para a lentidão da reação. Certamente, não se pode afirmar que este fenômeno causa a desaceleração brusca da velocidade de reação que ocorre nos primeiros minutos de reação (BIZ *et al.*, 2013).

Assim como no caso da degradação enzimática da pectina, a degradação de outros polissacarídeos, como a celulose e o amido, é lenta. Para estes substratos, os fenômenos que causam esta lentidão já foram determinados. No caso das celulases, o principal fenômeno é o de *burst*, no qual as enzimas inicialmente liberam vários produtos rapidamente, mas depois ficam estagnadas em regiões amorfas da celulose (VÄLJAMÄE *et al.*, 1998; PRAESTGAARD *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2012). No caso das amilases, o fenômeno se deve à diferença entre as atividades das  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases (KOLJONEN *et al.*, 1995; BRANDAM *et al.*, 2003; PRESEČKI *et al.*, 2013).

O presente trabalho propõe a caracterização da degradação enzimática de substratos pécticos, avaliando se os fenômenos acima descritos, ou outros, que poderiam explicar a desaceleração inicial da reação.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O POTENCIAL DAS BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA NO BRASIL

Uma biorrefinaria é uma indústria que se baseia na utilização integral de biomassa. Analogamente às refinarias de petróleo, uma biorrefinaria visa o aproveitamento de todas as frações de uma fonte de biomassa para uma produção diversificada. Com isso, é possível produzir pequenos volumes de produtos com alto valor agregado, grandes volumes de produtos com baixo valor (como os biocombustíveis) e, ainda, energia para o funcionamento da própria biorrefinaria por meio do aproveitamento dos resíduos destes processos (NREL, 2011).

O Brasil é um país com intensa atividade agrícola e, além dos resíduos do processamento da cana-de-açúcar, também gera outras biomassas a partir da agroindústria, esse é o caso do resíduo de polpa cítrica proveniente das indústrias de suco. Uma biorrefinaria de polpa cítrica teria grande potencial, pois o Brasil produz  $1,8 \times 10^7$  toneladas de laranja ao ano (FAOSTAT, 2011) e, dessas,  $1,3 \times 10^7$  toneladas são destinadas à produção de suco de laranja (REVISTA RURAL, 2000). Visto que de 50 a 60% da fruta processada é resíduo (WILKINS *et al.*, 2007), cerca de  $6,5 \times 10^6$  toneladas de resíduo cítrico úmido são produzidos no Brasil anualmente.

O resíduo cítrico é usualmente utilizado na sua forma integral para a formulação de ração animal (TRIPODO *et al.*, 2004) ou para a geração de biogás (LAPUERTA *et al.*, 2008), ou é simplesmente descartado. No entanto, o simples descarte pode se tornar um problema ambiental, pois o resíduo cítrico naturalmente irá se putrefazer, podendo contaminar os solos e cursos de água próximos ao local de descarte e, ainda, gerar uma quantidade muito alta de metano (MA *et al.*, 1993). Por sua vez, a destinação à ração animal e geração de biogás, apesar de não acarretar em problemas ambientais, traz um retorno econômico muito baixo (LÓPEZ *et al.*, 2010). Com isso, é necessário buscar um melhor aproveitamento da polpa cítrica, como em uma biorrefinaria.

A polpa cítrica é composta por pectina, material lignocelulósico e óleos essenciais, onde a pectina corresponde a maior parte. Já foram propostos esquemas para o uso integrado da polpa cítrica, como o descrito na Figura 1 (POURBAFRANI *et al.*, 2010). Neste esquema, o óleo D-limoneno pode ser isolado e vendido, pois possui alta aplicabilidade na indústria de alimentos como flavorizante e na indústria de cosméticos como aromatizante (LÓPEZ *et al.*, 2010). O material lignocelulósico pode ser empregado na geração de etanol ou metano através de fermentação (LOHRASBI *et al.*, 2010; LÓPEZ *et al.*, 2010; POURBAFRANI *et al.*, 2010; BOLUDA-AGUILAR e LÓPEZ-GÓMEZ, 2013). A pectina, por sua vez, pode ser isolada e utilizada na indústria alimentícia, ou pode ser degradada e utilizada na fermentação, junto com o material lignocelulósico hidrolisado, para gerar biocombustíveis. Ainda, pode ser degradada e os produtos recuperados de sua degradação podem ser utilizados em diversas indústrias. Por fim, os resíduos dos processos de isolamento dos principais componentes da biorrefinaria podem ser convertidos a biogás.

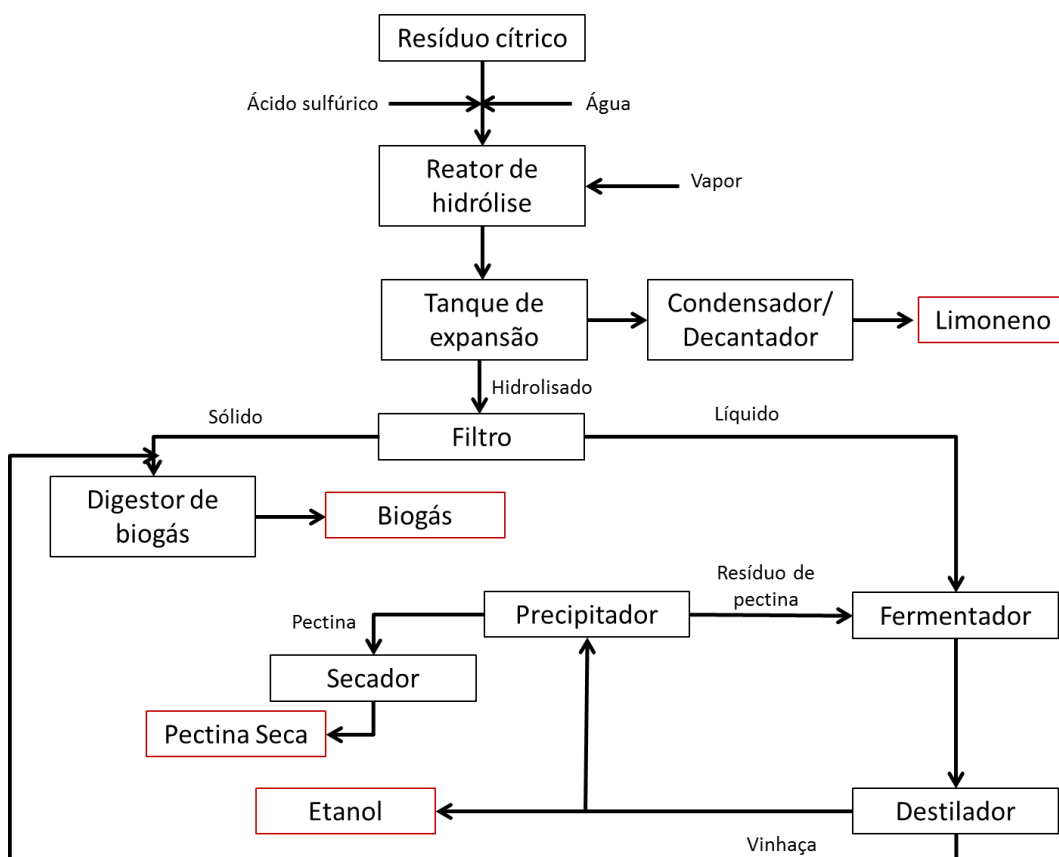


FIGURA 1 - BIORREFINARIA COM USO INTEGRADO DE POLPA CÍTRICA  
Esquema de biorrefinaria com a produção de limoneno, pectina e biocombustíveis.  
FONTE: POURBAFRANI *et al.*, 2010.

A pectina isolada pode ser utilizada como um agente geleificante na indústria de alimentos (MAY, 1990) e como um estabilizante na produção de bebidas lácteas e iogurtes (WILLATS *et al.*, 2006). Entretanto, o mercado para o comércio de pectina encontra-se saturado. Visto que a produção anual de  $6,5 \times 10^6$  toneladas de casca de laranja (com 80% de umidade) no Brasil corresponde a  $1,3 \times 10^6$  toneladas secas de casca de laranja e, ao considerar um teor de cerca de 15% disto sendo pectina (MAMMA *et al.*, 2008), o Brasil teria a capacidade de produzir cerca de  $2 \times 10^5$  toneladas de pectina por ano. Como o mercado mundial de pectina é de  $4,2 \times 10^4$  toneladas por ano (STAUNSTRUP, 2009), boa parte da pectina produzida em biorrefinarias acabaria sem uso. Por esta razão, é interessante investigar a possibilidade de degradação da pectina para a geração de outros produtos.

A degradação total da pectina, ou sacarificação, gera monômeros que podem ser fermentados, junto com os açúcares provenientes da sacarificação do material lignocelulósico, na geração de biocombustíveis (WILKINS *et al.*, 2007; BOLUDA-AGUILAR *et al.*, 2010; EDWARDS e DORAN-PETERSON, 2012; LOHRASBI *et al.*, 2010; OBEROI *et al.*, 2010; BOLUDA-AGUILAR e LÓPEZ-GÓMEZ, 2013). Entretanto, para a fermentação dos resíduos ricos em pectina a etanol, é preciso, primeiramente, o isolamento de uma cepa que consiga metabolizar o ácido D-galacturônico a etanol, pois este é o monômero em maior quantidade na pectina (EDWARDS e DORAN-PETERSON, 2012). Além disso, na metabolização deste açúcar, o etanol e o acetato são formados em igual quantidade, por o ácido D-galacturônico ser mais oxidado que outros açúcares.

A pectina pode, ainda, ser degradada a oligômeros com atividade biológica ou a monômeros, que são intermediários químicos importantes para a produção de acidulantes, surfactantes, ácido ascórbico e bioplástico (LINERS *et al.*, 1992; WERPY e PETERSEN, 2004; HOLCK *et al.*, 2011; OLMOS e HANSEN, 2012). O excedente mundial na produção de pectina e as dificuldades na fermentação dos açúcares resultantes da degradação da pectina na geração de biocombustíveis indicam que a produção de oligômeros e monômeros gerados na degradação da pectina será mais economicamente vantajosa para uma biorrefinaria.

## 2.2. A PECTINA CÍTRICA E OS PRODUTOS DE SUA DEGRADAÇÃO

### 2.2.1. Estrutura da pectina

A porcentagem de pectina em resíduos agroindustriais é bem variável (TABELA 1). No caso de resíduos cítricos, especificamente, a pectina pode representar de 14 a 23% da massa seca de resíduos cítricos (MARIN *et al.*, 2007; MAMMA *et al.*, 2008).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE PECTINA EM % (m/m)

<b>Biomassa</b>	<b><sup>a</sup>Polpa de Laranja</b>	<b><sup>b</sup>Polpa de Tangerina</b>	<b><sup>c</sup>Casca de Soja</b>
Cinzas	2,6	3,0	1 – 5,8
Açúcares	9,6	21,6	-
Gordura	4,0	-	-
Proteína	9,1	-	9,0 – 14,0
Pectina	23,0	14,2	6,0 – 15,0
Lignina	7,5	8,9	1,0 – 4,0
Celulose	37,1	20,8	29,0 – 51,0
Hemicelulose	11,0	17,2	10,0 – 20,0

FONTE: <sup>a</sup> MARIN *et al.* (2007); <sup>b</sup> BOLUDA-AGUILAR *et al.* (2010); <sup>c</sup> MIELENZ *et al.*, (2009).

O principal componente da pectina é o ácido D-galacturônico. A porcentagem deste açúcar não somente varia de acordo com a fonte da pectina, mas também depende do modo de recuperação da pectina, pois diferentes métodos podem levar à perda de certas estruturas da pectina, impactando assim na composição monossacarídica total (VRIES *et al.*, 1981; GROHMANN *et al.*, 1995; LIMBERG *et al.*, 2000).

O termo pectina não representa somente um tipo de carboidrato. De fato, a pectina consiste em várias subestruturas, com composição monossacarídica heterogênea, que são ligadas covalentemente. As subestruturas mais recorrentes na pectina são: a homopoligalacturonana (HG),

a ramnogalacturonana I (RG-I), a ramnogalacturonana II (RG-II), a xilogalacturonana (XG) e a arabinogalactana I (AG-I).

A subestrutura mais abundante na pectina (representando cerca de 60% da massa) é também a mais simples: a HG. Esta subestrutura é um polímero linear de resíduos de ácido D-galacturônico com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (Figura 2A). Esta estrutura é parcialmente metil-esterificada no C6 dos resíduos, e pode ser acetilesterificada em O-2 ou O-3 (YAPO *et al.*, 2007). A HG é a estrutura responsável pela pectina como agente geleificante, pois participa na formação de pontes de cálcio, como as representadas na Figura 2B (LINERS, THIBAUT e VAN CUTSEM, 1992). A subestrutura XG é uma variação desta homopoligalacturonana, com uma cadeia principal de ácido D-galacturônico com ramificações ocasionais de xilose.

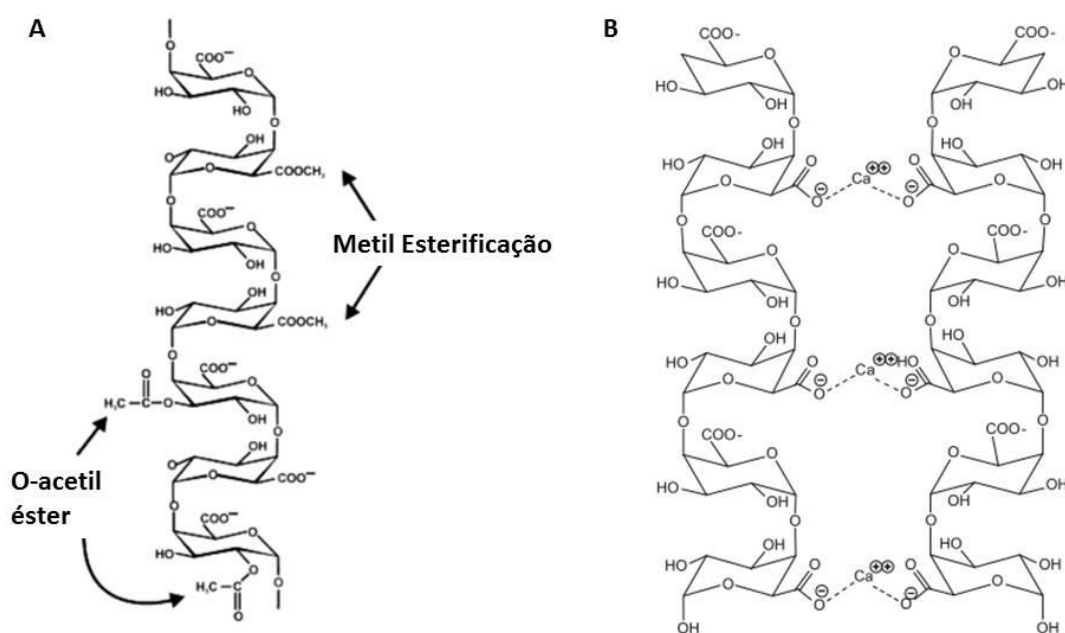


FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HOMOPOLIGALACTURONANA.

(A) Estrutura da HG, com metil esterificações em C6 e metil esterificações em O3. (B) Estrutura de ligação cruzada entre HGs, intermediadas por íons de cálcio.

FONTE: CAFFALL e MOHNEN (2009).

A segunda subestrutura mais abundante na pectina é a RG-I, que representa de 20 a 35% da pectina. Ela consiste em uma cadeia repetida do dissacarídeo formado por ácido D-galacturônico e ramnose ( $[\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1-4-}]_n$ ). Esta cadeia contém ramificações de  $\alpha$ -L-arabinose alternando com

ramificações de  $\beta$ -D-galactose, e algumas inserções de  $\alpha$ -L-fucose e  $\beta$ -D-glucose (FIGURA 3). A AG-I normalmente é uma ramificação em RG-I, e a cadeia principal da ramificação é composta de resíduos de  $\beta$ -D-galactose ligados por ligações  $\alpha$ -1,4, com alguns resíduos de  $\alpha$ -L-arabinose ligados ao O-3 dos resíduos de galactose.

A RG-II é a subestrutura mais complexa que compõe a pectina. Ela compreende cerca de 10% da pectina e, ao contrário da RG-1, possui resíduos de ramnogalacturonana somente nas ramificações, com uma cadeia principal de resíduos de ácido D-galacturônico ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 (tal qual a HG). As ramificações consistem em até 20 diferentes resíduos de açúcares (FIGURA 3) (RIDLEY *et al.*, 2001; O'NEILL *et al.*, 2004).

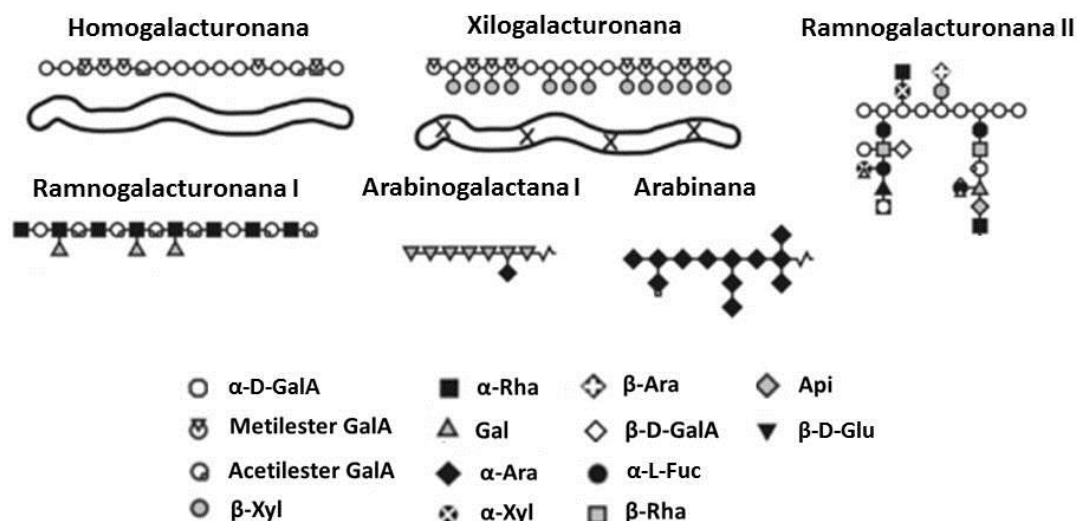


FIGURA 3 - SUBESTRUTURAS DA PECTINA  
 FONTE: VINCKEN *et al.* (2003).

A necessidade de tratamentos químicos severos ou digestão parcial da pectina por enzimas especializadas para que haja a liberação das subestruturas individuais de HG, RG-I e RG-II prova que todas essas subestruturas da pectina estão ligadas covalentemente (MOHNEN, 2008), mas não existe um consenso para o modo como estas subestruturas estão dispostas na pectina. De um lado, Coenen *et al.* (2007) e Nakamura *et al.* (2002) afirmam que HG, RG-I e RG-II estão ligados por suas cadeias principais (FIGURA 4A). Por outro lado, Vincken *et al.* (2003) afirmaram que a pectina é

composta por uma cadeia principal de RG-I com ramificações contendo as outras estruturas (HG, RG-II, XG, AG-I) (FIGURA 4B).

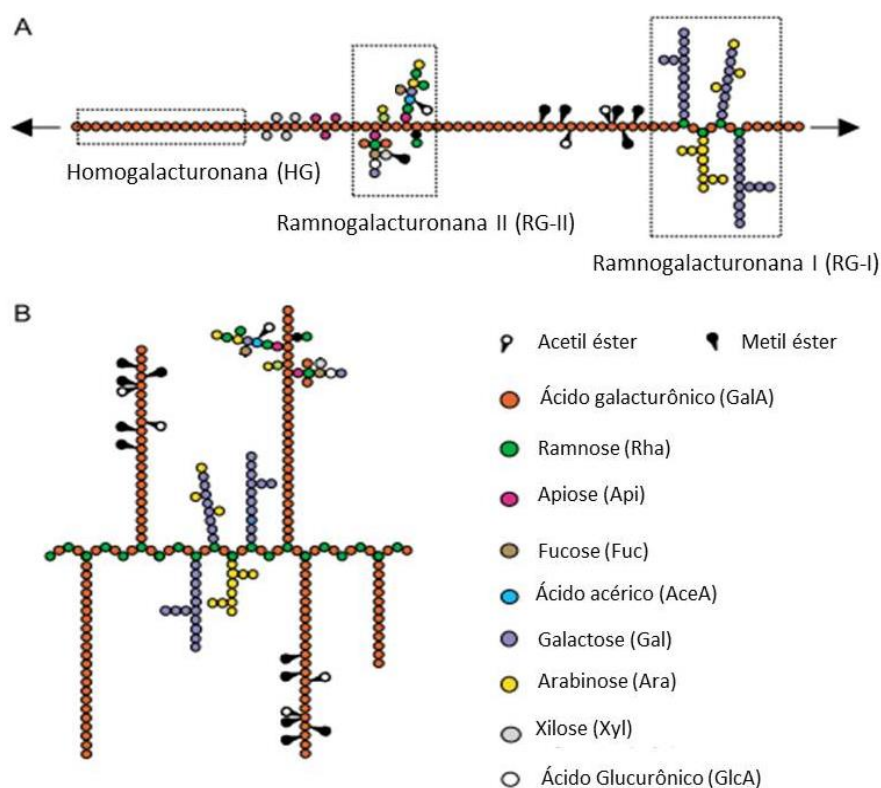


FIGURA 4 - ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA A PECTINA.

(A) mostra a estrutura clássica, com as cadeias principais de HG, RG-I e RG-II conectadas. (B) Mostra nova estrutura proposta, onde RG-I é a cadeia principal e as outras estruturas são cadeias laterais.

FONTE: WILLATS *et al.* (2006).

### 2.2.2. Produtos da degradação da pectina

Tanto os oligômeros quanto os monômeros derivados de pectina têm potenciais aplicações. Alguns oligômeros pequenos possuem atividade biológica: podem reprimir a acumulação de lipídeos, melhorar a resposta glicêmica ou agir como agentes antibacteriano, antioxidante ou anticancerígeno (YAMAGUCHI *et al.*, 1994; OLANO-MARTIN *et al.*, 2002; RASTALL *et al.*, 2005). Por sua vez, os produtos de degradação total da pectina são o ácido D-galacturônico, a glucose, a ramnose e a xilose. Dentre esses, o ácido D-galacturônico contribui com uma porcentagem de cerca de 75% (m/m) da pectina cítrica isolada (SIGMA ALDRICH, 2012).



O ácido D-galacturônico pode ser utilizado na indústria alimentícia como acidificante, mas também é um precursor de várias substâncias com alto valor agregado, como o ácido L-galactônico e o ácido mícico (ácido *meso*-galactárico) (RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA *et al.*, 2010). O ácido L-galactônico pode ser utilizado como aditivo em cosméticos, como acidulante em alimentos, agente quelante em produtos de limpeza e também como retardador na formulação de concreto. Pode, ainda, ser um intermediário na síntese de ácido ascórbico (SINGH e KUMAR, 2007). O ácido mícico, por sua vez, pode ser utilizado na substituição do ácido tartárico em refrigerantes ou em fermento químico. Ele também pode ser convertido para ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA), que pode ser utilizado na produção de um substituto do politereftalato de etileno (PET). De fato, o FDCA é apontado como um dos 12 derivados de açúcar mais valiosos provenientes da biomassa (WERPY e PETERSEN, 2004).

Para a obtenção de oligômeros ou de ácido D-galacturônico, é necessário um processo eficiente de degradação da pectina, com consequente recuperação dos oligômeros e monômeros liberados.

### 2.3. OBTENÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO A PARTIR DE SUBSTRATOS PÉCTICOS

Três técnicas podem ser utilizadas para degradar substratos pécticos (substratos que contenham a pectina ou subestruturas da pectina) ou a própria pectina isolada: a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática e a combinação de ambas.

A eficiência da hidrólise ácida de substratos pécticos depende do ácido utilizado, da temperatura de reação, do tempo de hidrólise e da concentração do substrato a ser degradado. Entretanto, apesar de diversos esforços para otimizar este processo (GROHMANN *et al.*, 1995; WILKINS *et al.*, 2007; TALEBNIA *et al.*, 2008), os rendimentos obtidos não são bons: a combinação de efeitos indutivos e conformacionais das carboxilas em C6 nos resíduos de ácido D-galacturônico faz com que as ligações glicosídicas entre os resíduos sejam resistentes a hidrólise ácida. Com a utilização de ácido suficientemente

concentrado, é possível quebrar o polímero de pectina, mas os monômeros gerados tendem ser degradados, gerando subprodutos indesejáveis, como lactonas (BLAKE e RICHARDS, 1968).

A degradação enzimática é mais eficaz na sacarificação de substratos pécticos. Os complexos enzimáticos contêm diversas enzimas que atacam diferentes ligações em todas as subestruturas da pectina e de outros substratos pécticos. Além disso, as enzimas não degradam os monômeros liberados. No entanto, alguns fatores dificultam o estabelecimento do processo enzimático, como o alto custo das enzimas utilizadas, que encarece o processo, e as limitações difusionais que ocorrem em altas concentrações de substrato.

Uma boa alternativa para reduzir custos e, ainda assim, conseguir um bom rendimento de sacarificação ao final do processo é de realizar um pré-tratamento físico do resíduo cítrico por explosão a vapor, em seguida, uma hidrólise ácida para ajudar na extração da pectina e, depois, a sacarificação enzimática da pectina (WILKINS *et al.*, 2007b; BOLUDA-AGUILAR *et al.*, 2010; OBEROI *et al.*, 2010; BOLUDA-AGUILAR e LÓPEZ-GÓMEZ, 2013). Até o presente momento, estes pré-tratamentos da polpa cítrica foram estudados visando principalmente a produção de etanol.

As considerações acima levam à conclusão que uma etapa de degradação enzimática será essencial na degradação de pectina. Visto isso, é imprescindível o conhecimento das enzimas com atividade pectinolítica e o modo de ação delas.

## 2.4. AS ENZIMAS UTILIZADAS NA SACARIFICAÇÃO DA PECTINA

A sacarificação da pectina por pectinases não ocorre pela ação de somente uma enzima, e sim de um complexo composto por diferentes enzimas (ANDERSEN *et al.*, 2012; BENOIT *et al.*, 2012). As principais enzimas presentes no complexo pectinolítico são as hidrolases e liases, que atuam diretamente na despolimerização da homopoligalacturonana (TABELA 2). Entre as hidrolases, estão as poligalacturonases, que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações  $\alpha$ -1,4 entre resíduos adjacentes de ácido D-galacturônico (FIGURA

5). As poligalacturonases podem ter ação endo, ou exo. Tanto as exopoligalacturonases quanto as endopoligalacturonases possuem pH ótimo entre 3,5 e 5,5 e peso molecular entre 40 e 65 kDa (JAYANI *et al.*, 2005).

As endopoligalacturonases levam a uma diminuição significativa da viscosidade de uma solução de pectina. Embora, esta redução de viscosidade não seja proporcional à quantidade de ligações glicosídicas hidrolisadas, pois, se o ataque hidrolítico realizado por uma endopoligalacturonase ocorrer no meio da cadeia de pectina, isso representará uma maior diminuição na viscosidade da solução do que se o ataque hidrolítico ocorrer perto de uma extremidade da cadeia. Algumas endopoligalacturonases realizam um ataque processivo ao seu substrato (BENEN *et al.*, 1999; PARENICOVÁ *et al.*, 2000); este tipo de ataque ocorre quando a enzima, ao encontrar o polímero, realizar vários ataques sucessivos, liberando diversos produtos, antes de se desligar do polímero restante.

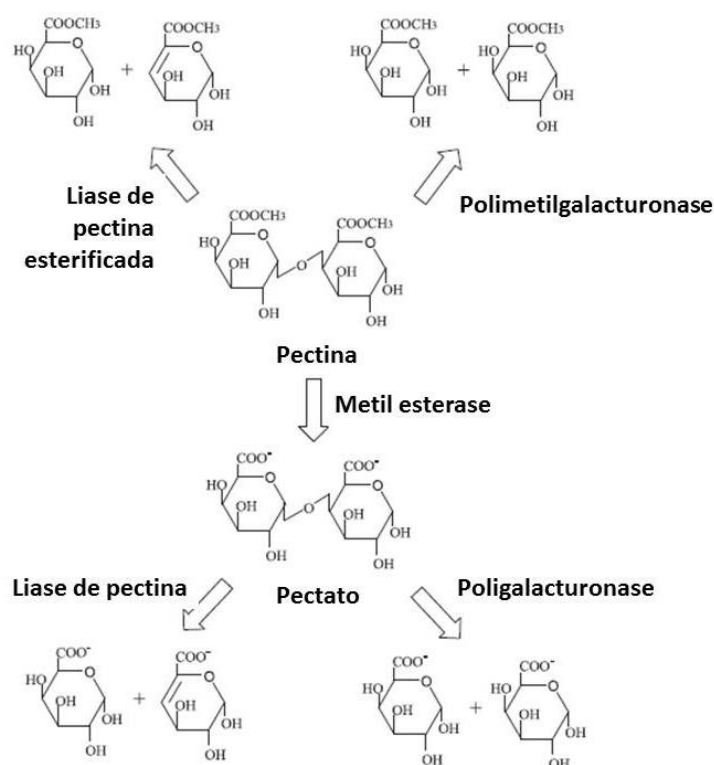


FIGURA 5 - MODO DE AÇÃO DAS HIDROLASES E LIASES EM UMA MOLÉCULA DE PECTINA.

Onde as enzimas liase de pectina esterificada e liase de pectina são enzimas depolimerizadoras da pectina por via de transeliminção, as enzimas polimetilgalacturonase e poligalacturonase são enzimas depolimerizadoras da pectina por via hidrolítica e a enzima metil esterase que age por via hidrolítica.

FONTE: ALKORTA *et al.* (1998).

A maior parte das endopoligalacturonases apresenta cinco subsítios em seu sítio ativo (FIGURA 6), onde um resíduo de ácido D-galacturônico se encaixa em cada subsítio para que ocorra a quebra hidrolítica entre os subsítios -1 e +1. A presença de determinados aminoácidos com maior afinidade pelo substrato nestes subsítios é o que determina se a endopoligalacturonase terá atividade processiva (BENEN *et al.*, 1999; PAGES *et al.*, 2001).

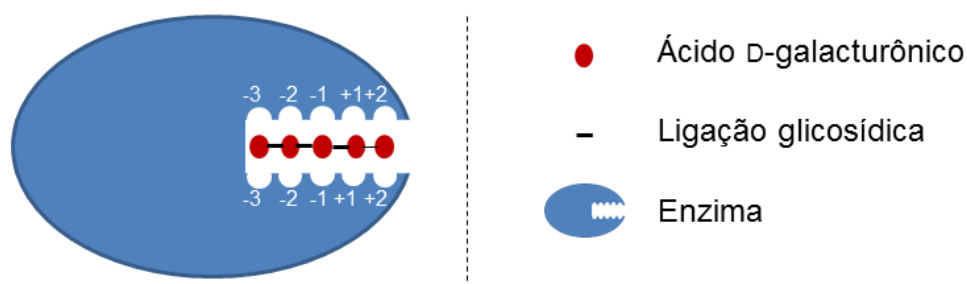


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DOS SUBSÍTIOS NO SÍTIO ATIVO DE UMA ENDOPOLIGALACTURONASE  
FONTE: ADAPTADO DE ABBOTT e BORASTON (2007) e MASSA *et al.* (2007).

As exopoligalacturonases de origem fúngica produzem ácido D-galacturônico, enquanto as de origem bacteriana produzem ácido digalacturônico. As exopoligalacturonases fúngicas geralmente agem a partir da extremidade não redutora (PEDROLLI *et al.*, 2009; PIJNING *et al.*, 2009) e algumas dessas são sensíveis a inibição pelo produto, o ácido D-galacturônico (KESTER *et al.*, 1996; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; MERTENS, 2013).

As liases de pectina, por sua vez, catalisam a quebra não hidrolítica das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de ácido D-galacturônico (YADAV *et al.*, 2009). A reação é uma transeliminação e envolve a eliminação de um H no C5 do resíduo de ácido D-galacturônico à direita da ligação glicosídica, formando um produto insaturado  $\Delta$  4:5 (FIGURA 5).

Tipicamente, o complexo pectinolítico também contém enzimas auxiliares como as esterases, as xilosidades, as galactanases, as arabinases e as ramnogalactanases. Existem dois tipos de esterases. As metil esterases de pectina catalisam a desesterificação de ligações metil-éster nos C6 de resíduos

de ácido D-galacturônico (FIGURA 5), gerando o ácido pécico (pectina sem o grupo metil) e metanol. Por sua vez, as acetil esterases de pectina catalisam a desesterificação de ligações acetil éster em O3 e O2 de resíduos de ácido D-galacturônico, gerando o ácido pécico e acetato (PEDROLLI *et al.*, 2009).

As outras enzimas auxiliares são responsáveis pela quebra de ligações glicosídicas entre os outros açúcares presentes nas regiões de RG, XG e AG (FIGURA 7). A variedade de enzimas presentes no complexo pectinolítico, assim como a quantidade de cada enzima produzida, determina a capacidade do microrganismo em degradar a pectina por completo ou não (BENOIT *et al.*, 2012).

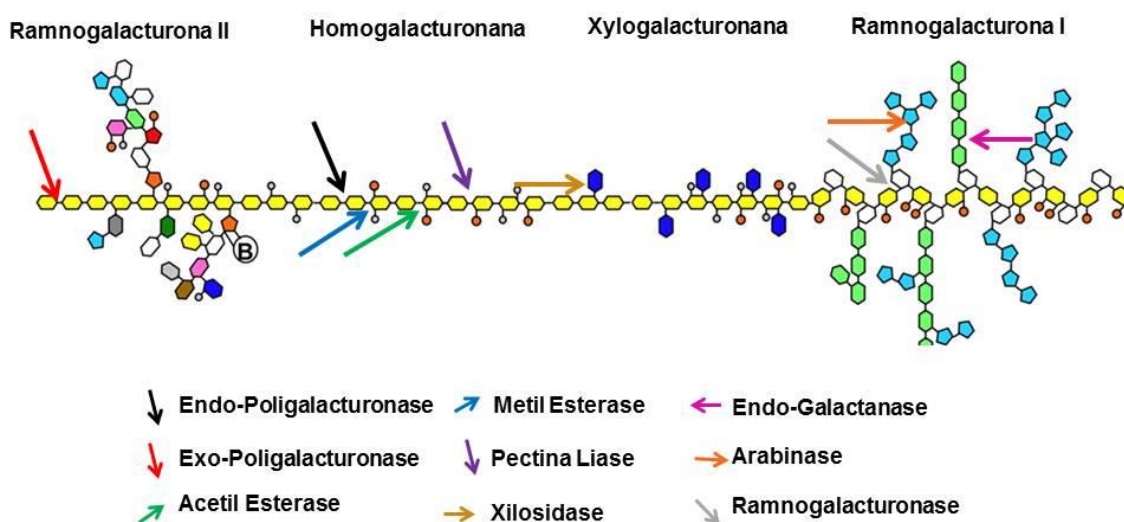


FIGURA 7 - AÇÃO DE DIVERSAS ENZIMAS NA ESTRUTURA DA PECTINA  
FONTE: ADAPTADO A PARTIR DE ZHANG (2006).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS MAIS COMUNS

Enzima		Número E.C.	Mecanismo de ação	Substrato preferencial	Produto
Esterase	Pectina metil esterase	3.1.1.11	Hidrólise	Pectina	Ácido péctico + Metanol
Hidrolases	Endopoligalacturonase	3.2.1.15	Hidrólise	Ácido péctico	Oligogalacturonatos
	Exopoligalacturonase	3.2.1.67	Hidrólise	Ácido péctico	Monogalacturonatos
	Endopolimetilgalacturonase	Nd	Nd	Pectina altamente esterificada	Oligometilgalacturonatos
Liasas	Endopoligalacturonase liase	4.2.2.2	Trans-eliminação	Ácido péctico	Oligogalacturonatos insaturados
	Exopoligalacturonase liase	4.2.2.9	Trans-eliminação	Ácido péctico	Monogalacturonatos insaturados

nd representa que a informação não foi apresentada pelo autor da tabela  
 FONTE: JAYANI *et al.* (2005).

## 2.5. A CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS E OUTROS CARBOIDRATOS

### 2.5.1. Caracterização da degradação de substratos pécticos

Os complexos de pectinases são muito utilizados na indústria de alimentos para a redução de viscosidade ou solubilização de pectina na clarificação de bebidas (ALKORTA *et al.*, 1998). Como consequência, a maioria dos estudos já feitos sobre a cinética de complexos pectinolíticos foi voltada à capacidade de redução da viscosidade de soluções contendo substratos pécticos, com o foco na ação das endopoligalacturonases.

Em uma biorrefinaria baseada em polpa cítrica, o interesse na utilização de pectinases é na sacarificação dos substratos contendo pectina, não na redução da viscosidade do meio reacional (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; RICHARD e HILDITCH, 2009; LOHRASBI *et al.*, 2010; OBEROI *et al.*, 2010; POURBAFRANI *et al.*, 2010). Para otimizar o processo de sacarificação, é necessário compreender como os complexos pectinolíticos agem nos substratos.

Muitos estudos foram feitos para caracterizar a degradação da pectina ou ácido poligalacturônico por enzimas isoladas, produzidas por diferentes microrganismos. Nestes estudos, foram determinados os parâmetros da equação de Michaelis-Menten e o pH ótimo. O modo de ataque de enzimas isoladas, em alguns casos, também foi identificado. Nestes estudos foi definida a probabilidade de hidrólise por endopoligalacturonases em diversas posições de oligossacarídeos e, também a influência de acetilações e metilações na ação destas enzimas (PARENICOVÁ *et al.*, 1998; BENEN *et al.*, 1999; PARENICOVÁ *et al.*, 2000a; PARENICOVÁ *et al.*, 2000b; BONNIN *et al.*, 2003; GADRE *et al.*, 2003; MASSA *et al.*, 2007; ANDRÉ-LEROUX *et al.*, 2009).

Entretanto, poucos estudos focaram a cinética de sacarificação catalisada por complexos de pectinases (BACIU e JÖRDENING, 2004; KHAMSEH e MICCIO, 2011; BIZ *et al.*, 2013). Em um destes estudos, Biz *et al.* (2013) relataram uma desaceleração significativa da velocidade de liberação de pontas redutoras nos primeiros minutos da reação; este fenômeno também é

aparente nos resultados anteriormente publicados por Baciú e Jördening (2004).

Tanto para reações utilizando exopoligalacturonases (BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; MERTENS, 2013) quanto para reações utilizando complexos de pectinases (BACIU e JÖRDENING, 2004; KHAMSEH e MICCIO, 2011), uma outra característica apontada por diversos autores é a necessidade de longos tempos para se conseguir um bom grau de sacarificação. Esta lentidão foi atribuída à inibição pelo produto final da reação, o ácido D-galacturônico.

A inibição de complexos de pectinases pelo ácido D-galacturônico foi caracterizada por Baciú e Jördening (2004) e Khamseh e Miccio (2011), com a determinação do parâmetro  $K_{MP*}$ . O asterisco denota que a constante é aparente, por envolver um complexo de pectinases, não uma enzima isolada. Os valores de  $K_{MP*}$  foram  $1,05 \text{ g L}^{-1}$  para a degradação de pectina cítrica por Pectinex 100L (BACIU e JÖRDENING, 2004) e  $6,96 \text{ g L}^{-1}$  para a degradação de polpa cítrica por Pectinex Ultra SPL (KHAMSEH e MICCIO, 2011). Entretanto, os valores relatados não são confiáveis, uma vez que os autores não tomaram o cuidado de determinar as velocidades iniciais dos ensaios com precisão.

### 2.5.2. Caracterização da degradação de outros polissacarídeos

A lentidão na sacarificação de polissacarídeos ocorre também na hidrólise de amido pelas amilases e de celulose pelas celulasas. No caso dos complexos de celulasas, além da lentidão na sacarificação, também é identificada uma desaceleração no início da reação. Neste caso, embora exista o fenômeno de inibição pelo produto, esta inibição se provou incapaz de explicar a desaceleração inicial na reação (VÄLJAMÄE *et al.*, 1998) e, com isso, diversas outras proposições foram feitas para explicar a desaceleração nos primeiros minutos (VÄLJAMÄE *et al.*, 2001; ZHANG e LYND, 2004; BOMMARIUS *et al.*, 2008; BANSAL *et al.*, 2009; HALL *et al.*, 2010; BANSAL *et al.*, 2012; IGARASHI *et al.*, 2011; KURASIN e VÄLJAMÄE, 2011a; PRAESTGAARD *et al.*, 2011; JALAK *et al.*, 2012; MURPHY *et al.*, 2012b).



Entre essas proposições, duas merecem destaque: Primeiro, a depleção rápida de substrato preferencial e, segundo, a estagnação das enzimas após uma fase de *burst*.

A ideia de depleção rápida do substrato preferencial se baseia na possibilidade de as enzimas consumirem todo o substrato facilmente acessível nos primeiros minutos de reação. Após isso, a velocidade de reação diminuiria, pois restariam somente regiões mais difíceis de serem degradadas. Entretanto, esta ideia não explica a desaceleração que ocorre no caso das celulases: ao adicionar mais enzima ao meio reacional após a desaceleração, a velocidade aumenta para o mesmo valor que a velocidade inicial. Se o substrato preferencial fosse consumido no início da reação, a velocidade não voltaria para o valor inicial com a nova adição de enzimas (PRAESTGAARD *et al.*, 2011; CRUYS-BAGGER *et al.*, 2012; MURPHY *et al.*, 2012).

O fenômeno de *burst* se caracteriza pela presença de duas fases no ciclo de catálise de uma enzima, uma primeira fase rápida, seguida por uma fase lenta. No complexo de celulases, as duas enzimas responsáveis pela despolimerização da celulose, as celobiohidrolases e as endoglucanases, apresentam o fenômeno de *burst*. Para as celobiohidrolases, a primeira fase corresponde a um ataque processivo na cadeia de celulose. Ao encontrar um obstáculo, a enzima tem que dissociar para encontrar outro ponto de ataque, mas a dissociação é lenta (JALAK e VÄLJAMÄE, 2010; KURASIN e VÄLJAMÄE, 2011). Embora o ataque no próximo ponto de ataque, uma vez iniciado, seja rápido, a etapa limitante da dissociação faz com que a reação desacelere. As endoglucanases, por não terem comportamento processivo, catalisam a despolimerização da celulose aleatoriamente, elas são capazes de catalisar rapidamente diversas reações até encontrarem ao acaso os mesmos obstáculos que prejudicam as celobiohidrolases. Ao encontrar esses obstáculos as endoglucanases também ficam estagnadas. O momento em que boa parte das enzimas ficam estagnadas no substrato pode ser percebido como a desaceleração da velocidade de reação (MURPHY *et al.*, 2012). No caso das celulases, os obstáculos que dificultam a dissociação das enzimas normalmente são regiões amorfas no substrato ou intersecções entre duas regiões cristalinas (VÄLJAMÄE *et al.*, 1998; JALAK *et al.*, 2012).

No caso das amilases não é aparente a desaceleração no início da reação, no entanto, a lentidão do processo ocorre devido as  $\beta$ -amilases (exoenzimas) possuírem uma atividade específica muito menor que as  $\alpha$ -amilases (endoenzimas), desta forma as  $\beta$ -amilases acabam limitando a reação (BRANDAM *et al.*, 2003; PRESEČKI *et al.*, 2013).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A degradação de substratos pécticos por complexos de pectinases é um processo lento e, além disso, apresenta uma desaceleração pronunciada nos primeiros minutos de reação (BIZ *et al.*, 2013). Como foi mencionado na seção 2.5, estudos da degradação de outros substratos poliméricos por complexos enzimáticos identificaram fenômenos que talvez sejam responsáveis por essas dificuldades na degradação de substratos pécticos; como por exemplo: a inibição pelo produto, a depleção rápida de substrato acessível, a estagnação das enzimas em alguma estrutura do substrato após um período de *burst* e a existência de uma atividade menor em algumas enzimas presentes no meio reacional.

Embora a inibição pelo produto tenha sido identificada para algumas enzimas do complexo pectinolítico (KESTER *et al.*, 1996; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; MERTENS, 2013), os estudos não foram realizados de maneira suficientemente criteriosa (BACIU e JÖRDENING, 2004; KHAMSEH e MICCIO, 2013). Além disso, até o presente momento não foi investigado se esta inibição seria a causa da desaceleração inicial na velocidade e as outras possíveis explicações para esta desaceleração não foram investigadas para a degradação de substratos pécticos pelo complexo pectinolítico.

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a reação de sacarificação enzimática de substratos pécticos por complexos de pectinases, com intuito de determinar o fenômeno responsável pela desaceleração inicial.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar a reação de degradação de substratos pécticos;
- Estudar a influência da inibição pelo produto no início da reação;
- Estudar a possibilidade de depleção rápida de substratos mais acessíveis;
- Estudar a possibilidade de fase de *burst* seguida de estagnação das enzimas em regiões específicas do substrato;
- Estudar a possibilidade da existência de enzimas que possuam uma eficiência catalítica reduzida e com isso limitem a reação.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática (LTFE) do Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal do Paraná.

### 4.1. REAGENTES E MATERIAIS

A pectina isolada de cascas cítricas (código P9135) e o ácido poligalacturônico (código 81325) utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Segundo o fabricante, a pectina cítrica isolada tem pelo menos 74% de ácido D-galacturônico e pelo menos 6,7% dos resíduos de ácido D-galacturônico são metil esterificados; enquanto o ácido poligalacturônico apresenta pureza de aproximadamente 95%, com massa molecular entre 25 e 50 kDa. Já a pectina cítrica de grau alimentício (Citrigel Comum C) utilizada nos ensaios de caracterização de sacarificação foi gentilmente cedida pela empresa Doce Aroma Aditivos e Ingredientes Ltda. Segundo a empresa, este produto possui pelo menos 50% de pectina, com um grau de esterificação de pelo menos 69%.

O ácido D-galacturônico (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) utilizado nas curvas analíticas de espectrofotometria e cromatográfica apresenta pureza mínima de 97%. O ácido 3,5-dinitrossalicílico utilizado nos ensaios para determinação de pontas redutoras por espectrofotometria foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda, com grau de pureza de 99%. Os outros reagentes utilizados para a preparação de tampões, acetato de sódio e ácido acético, e de fase móvel para a CLAE, ácido sulfúrico, eram de grau analítico.

Ambos complexos enzimáticos utilizados nos ensaios foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Um dos complexos é uma preparação de pectinases obtidas pela fermentação de *Aspergillus niger* (P4716). O outro complexo é a Pectinex Ultra SPL (P2611) produzida pela Novozymes a partir da fermentação de *Aspergillus aculeatus*. A partir deste momento o complexo

de pectinases de *Aspergillus niger* será denominado complexo N e o complexo de pectinases de *Aspergillus aculeatus* será denominado complexo A.

Ambos os substratos e complexos enzimáticos foram diluídos em uma solução tampão acetato de 2 mM, pH de 4,5 para a concentração desejada nos ensaios.

## 4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.2.1. Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS

Para a quantificação dos açúcares redutores, utilizou-se o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Para uma amostra de 0,5 mL, foi adicionado 0,5 mL de solução de DNS. A mistura foi incubada a 100°C por 5 min e, após isso, foi adicionado 4 mL de água à mistura. A absorbância das amostras foi lida a 540 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific) e a curva padrão foi construída com ácido D-galacturônico, em concentrações variando entre 0 e 2 g L<sup>-1</sup>

### 4.2.2. Determinação de estabilidade da atividade dos complexos a temperatura de ensaio

Tubos de ensaio contendo 0,25 mL de solução de enzima (diluída 2500 vezes) foram incubados em um banho a 30°C por períodos de 5 min a 72 h. Após isso, 0,25 mL de solução de pectina a 1% (m/v) foi adicionada aos tubos, que foram incubados, a 30°C, por mais 20 min. Então, os tubos foram colocados em um banho de gelo até ser adicionada a solução de DNS a todos os tubos. Para o branco, foram utilizados tubos com a incubação de substrato, onde a enzima só foi adicionada após a adição de DNS. Os ensaios foram feitos em duplicata e foi monitorada a quantidade de pontas redutoras liberadas pelo método de DNS, conforme o item 4.2.1. Nestes ensaios, a atividade foi expressa em termos de unidades (U), onde uma unidade de atividade

corresponde à produção de 1 mM de pontas redutoras por minuto nas condições do ensaio.

#### 4.2.3. Quantificação de ácido D-galacturônico

O ácido D-galacturônico foi quantificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado o sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System, com amostrador automático, forno de aquecimento de coluna e detector para índice de refração (IR). Foi utilizada uma coluna de troca iônica, *Agilent Hi-Plex H* (Agilent Technologies, EUA), mantida a 65°C, com pré-coluna catiônica Cation-H (*Bio-Rad*). A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) 5 mmol L<sup>-1</sup>, a 0,55 mL min<sup>-1</sup>. O sinal do detector IR foi processado pelo software Agilent OpenLAB Chromatography Data System e convertido para concentração utilizando uma curva de calibração construída com ácido D-galacturônico em concentrações de 0 a 5 g L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4. Quantificação de proteínas

A quantificação da concentração de proteínas presentes nos complexos enzimáticos foi feita seguindo o método de Bradford (1976). Com isso, foi determinado que os complexos N e A apresentam as concentrações de proteínas totais de 8,24 mg mL<sup>-1</sup> e 7,04 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 4.2.5. Distribuição de tamanho dos oligômeros

A análise da distribuição de tamanho dos oligômeros gerados ao longo da reação foi realizada por cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC). As amostras retiradas dos ensaios enzimáticos foram fervidas por 15 min para parar a reação e, então, congeladas, para serem

lioofilizadas em seguida. Após isso, foram separadas alíquotas de 1 mg de cada amostra, que foram solubilizadas em 1 mL de solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 mmol  $\text{L}^{-1}$  (nitrito de sódio) contendo 0,02% de  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio). Em seguida, as amostras solubilizadas foram filtradas em membrana de acetato de celulose com o tamanho do poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . As amostras foram injetadas no sistema de HPSEC, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo WATERS 2410 e um detector de índice de refração (IR) conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo Dawn DSP-F, Wyatt Technologies Corporation, EUA). Os dados foram coletados e analisados pelo programa Wyatt Technology ASTRA.

### 4.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

#### 4.3.1. Ensaios para a determinação de velocidade inicial de reação

Para determinar os parâmetros aparentes da equação de Michaelis-Menten para os dois complexos enzimáticos, foram determinadas as velocidades iniciais da reação em diferentes concentrações de substrato. Cada complexo de enzimas foi diluído 2500 $\times$  antes de ser adicionado nestes ensaios.

Em cada ensaio, foi adicionado a 22 tubos de ensaio, 0,25 mL de substrato. Os tubos foram pré-incubados a 30°C. Então, a cada 30 s, foram adicionadas alíquotas de 0,25 mL de solução de enzimas a dois tubos. Isso foi feito até completar 5 min e, então, os tubos foram retirados do banho, colocados no gelo e a quantidade de pontas redutoras formadas foi determinada pelo método de DNS, conforme o item 4.2.1.

Uma equação polinomial de segunda ordem ( $y = ax^2 + bx$ ) foi ajustada à curva de pontas redutoras ao longo do tempo. A velocidade inicial foi determinada como sendo igual ao coeficiente linear da equação.

Foi construído um gráfico de Hanes-Woolf, um gráfico com  $S_0/v_0$  na ordenada e  $S_0$  na abscissa, onde  $S_0$  é a concentração inicial de substrato usada e  $v_0$  é a velocidade inicial correspondente. Foi realizada uma regressão linear

para determinar os coeficientes linear e angular, a partir dos quais foram calculados os parâmetros cinéticos aparentes da equação de Michaelis-Menten,  $V_{max*}$  e  $K_{M*}$ , onde o \* representa que os parâmetros encontrados são aparentes. Os parâmetros são aparentes porque o sistema caracterizado trata-se de uma mistura de enzimas e não uma única enzima.

#### 4.3.2. Ensaios realizados em reator encamisado

Todas as reações de curta duração (até 37 min) foram realizadas em reatores de vidro encamisados com agitação magnética (FIGURA 8), com capacidade para até 150 mL de meio reacional. A solução do substrato, a  $10 \text{ g L}^{-1}$ , foi incubada no reator até atingir a temperatura do ensaio. Então, foi adicionado o mesmo volume de solução dos complexos enzimáticos (pré-incubados na mesma temperatura de ensaio), diluído 2500×. Desta forma, a concentração inicial de substrato foi de  $5 \text{ g L}^{-1}$  e os complexos enzimáticos foram diluídos, no total, 5000× no ensaio.

Nos experimentos que tinham como objetivo a determinação de pontas redutoras formadas ao longo de 37 min de reação, após adicionada a enzima ao reator, alíquotas de 0,5 mL de meio reacional foram retiradas e adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução de DNS em um banho de gelo. Isto foi feito em intervalos de 10 s até 2 min de reação, intervalos de 30 s até 15 min de reação e intervalos de 1 min até 37 min de reação. Depois de completados 37 min, os tubos utilizados foram retirados do banho de gelo e a concentração de pontas redutoras formadas foi determinada conforme o item 4.2.1.

Nos experimentos para a determinação da concentração de ácido D-galacturônico ao longo da reação, depois de adicionada a enzima ao reator, foram retiradas alíquotas de 10 mL de meio reacional nos tempos determinados. Após isso, as alíquotas foram fervidas por 15 min para a inativação das enzimas presentes e, em seguida, filtradas em filtro com poros no tamanho de  $0,22 \mu\text{m}$ , para futura injeção no sistema de CLAE.





FIGURA 8 – REATOR ENCAMISADO DE REAÇÃO ENZIMÁTICA.

Onde: (1) reator encamisado, (2) entrada de água na camisa do reator (3) saída de água da camisa, (4) agitador magnético (5) banho mantida a 30°C, com circulação de água pela camisa do reator

Fonte: O Autor (2013).

Os experimentos para estudar a inibição pelo produto nos primeiros 37 min ocorreram de maneira semelhante, com adição da quantidade de ácido D-galacturônico escolhida no início da reação. A quantidade de produto adicionada ao início de cada reação foi subtraída dos resultados obtidos, para determinar quanto produto foi liberado na reação. Os ensaios com diferentes concentrações de enzima inicial e com a reaplicação de enzimas ao longo da reação também seguiram esta metodologia.

Para os estudos com reaplicação de enzima, enquanto no início foram utilizadas soluções dos complexos na diluição usual de 2500×, nas reaplicações foram utilizadas soluções dos complexos diluídas somente 50×, a fim de não interferir na concentração dos solutos no meio reacional quando fosse feita a segunda aplicação dos complexos enzimáticos.

#### 4.3.3. Ensaios realizados em erlenmeyers

As reações acompanhadas até a estabilização da liberação de ácido D-galacturônico (72 h) foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL. Para tanto,

um volume de 75 mL de solução de substrato, a  $10 \text{ g L}^{-1}$ , foi acondicionado em erlenmeyers dentro de um agitador orbital. Após estabilizada a  $30^\circ\text{C}$ , a solução enzimática, diluída 2500 $\times$ , foi adicionada aos erlenmeyers no agitador orbital, com rotação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas em tempos determinados para a determinação de pontas redutoras liberadas pelo método de DNS (item 4.2.1), para a quantificação do ácido D-galacturônico pelo sistema de CLAE (item 4.2.3) e para a identificação inicial dos oligossacarídeos liberados ao longo da reação (item 4.2.4). Para a determinação do ácido D-galacturônico por CLAE e determinação da distribuição de tamanho dos oligossacarídeos gerados por HPSEC, as amostras foram fervidas por 15 min para a desnaturação térmica das enzimas. Após isso, as amostras destinadas à quantificação de ácido D-galacturônico por CLAE foram filtradas em membranas com poros no tamanho de  $0,22 \mu\text{m}$  e as amostras destinadas ao HPSEC foram congeladas.

#### 4.4. SIMULAÇÕES E TRATAMENTO DOS DADOS OBTIDOS

##### 4.4.1. Simulação do Modelo matemático desenvolvido

O modelo matemático descrito na Seção 5.5 foi resolvido utilizando o método de Runge-Kutta de integração numérica, através do programa TKSolver®.

##### 4.4.2. Determinação da velocidade de reação ao longo do ensaio

Nos ensaios com re-aplicação de enzima e com adição de diversas concentrações de enzima, foram calculadas as velocidades instantâneas ao longo da reação. Para suavizar o efeito do erro experimental nas concentrações de produto obtidas, foi utilizado o cálculo de uma média móvel. A concentração de produto suavizada para o  $i$ -ésimo tempo,  $[P]_i^*$ , é dada por:

$$[P]_i^* = \frac{[P]_{i-3} + [P]_{i-2} + [P]_{i-1} + [P]_i + [P]_{i+1} + [P]_{i+2} + [P]_{i+3}}{7} \quad (1)$$

onde  $[P]_{i-3}$  a  $[P]_{i+3}$  representam as concentrações determinadas experimentalmente nos três tempos anteriores a tempo  $i$ , no tempo  $i$  e nos três tempos posteriores a tempo  $i$ . Após isso, os valores suavizados foram utilizados para calcular a velocidade de reação,  $v_i$ , no tempo  $i$ ,  $t_i$ , conforme:

$$v_i = \frac{[P]_i^* - [P]_{i-1}^*}{t_i - t_{i-1}} \quad (2)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão organizados em cinco seções. A primeira seção trata da determinação dos parâmetros cinéticos aparentes para a degradação da pectina cítrica isolada e do ácido poligalacturônico, nas reações catalisadas pelos dois complexos de pectinases. A segunda seção contém os resultados referentes à caracterização do perfil de degradação dos substratos pécticos. Esta caracterização foi realizada tanto para períodos curtos de reação (os primeiros 37 min) quanto para períodos longos (72 h). Foram monitoradas a liberação de pontas redutoras e a liberação de ácido D-galacturônico. A terceira seção trata da investigação de cinco possíveis explicações para a desaceleração que ocorre nos primeiros minutos de reação. A quarta seção apresenta um modelo descritivo do processo de degradação de substratos pécticos por complexos de pectinases. Por fim, a quinta seção apresenta um modelo matemático para o processo.

### 5.1. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS

Primeiramente, foram determinadas as velocidades iniciais da reação de degradação dos substratos pécticos. O fato que os dados traçam retas no gráfico de Hanes-Woolf (FIGURA 9) mostra que o sistema segue a equação de Michaelis-Menten, mesmo que tenha sido usado um complexo enzimático e não uma enzima pura. Os parâmetros aparentes da equação de Michaelis-Menten e a constante de inibição pelo produto determinados a partir destes gráficos são mostrados na Tabela 3.

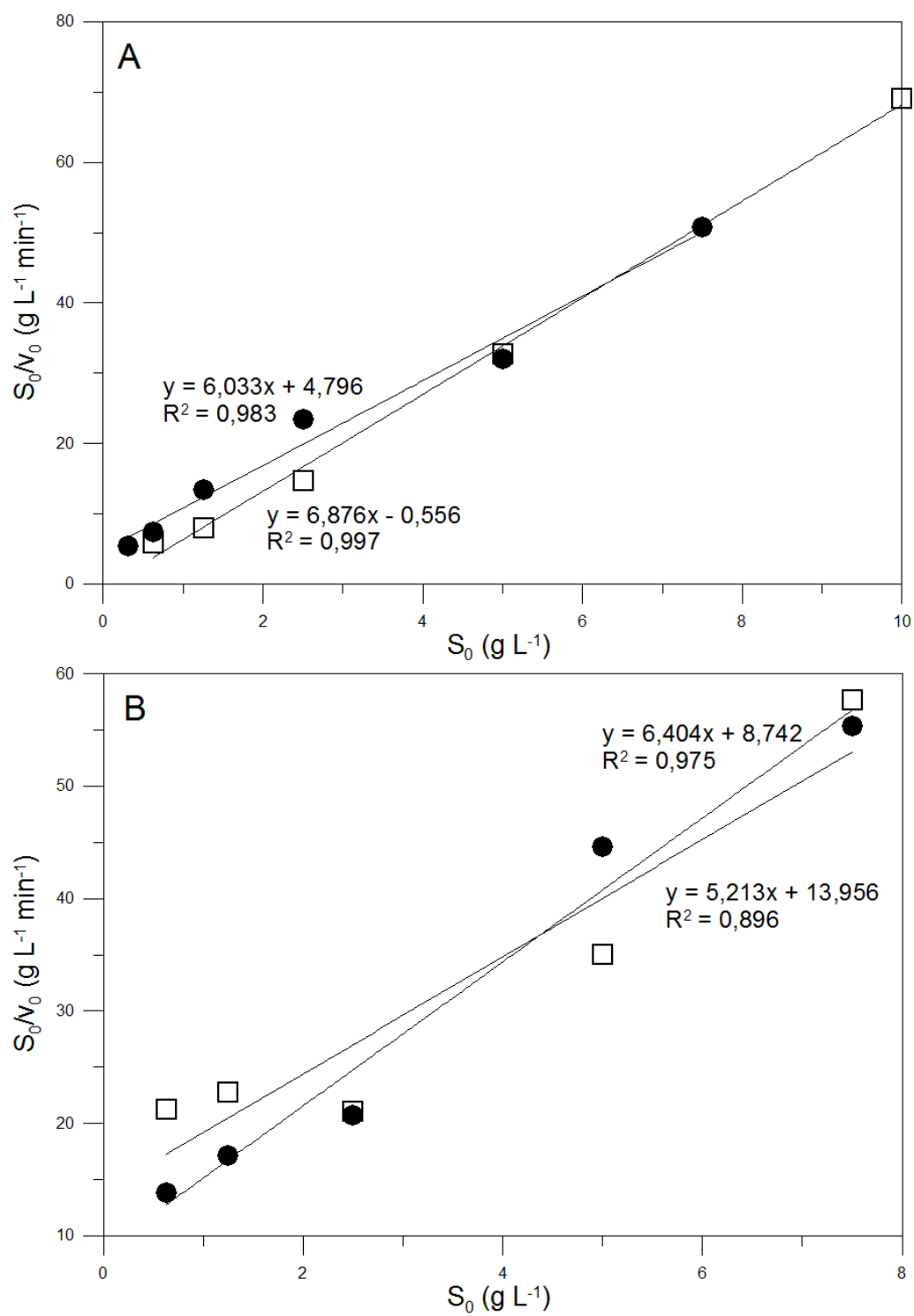


FIGURA 9 – GRÁFICO DE HANES-WOOLF PARA A OS VALORES ENCONTRADOS DE  $v_0$ . Valores para a degradação do (A) ácido poligalacturônico e a (B) pectina cítrica isolada, pelo (●) complexo N e pelo (□) complexo A. Os ensaios foram realizados a 30°C, em pH 4,5 por até 5 min.  
Fonte: O Autor (2013).

TABELA 3 - PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN.

Enzima	Complexo A		Complexo N	
Parâmetros	Pectina cítrica	Ácido poligalacturônico	Pectina cítrica	Ácido poligalacturônico
$V_{m\acute{a}x*}$ (g L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,19	0,15	0,16	0,17
$K_{M*}$ (g L <sup>-1</sup> )	2,7	0,1	1,4	0,8

Fonte: O Autor (2013).

Neste estudo, as concentrações dos dois complexos foram escolhidas com intuito de se obter valores próximos para  $V_{m\acute{a}x*}$  na degradação do ácido poligalacturônico. Utilizando estas mesmas concentrações dos complexos, na degradação da pectina cítrica isolada os valores de  $V_{m\acute{a}x*}$  foram semelhantes entre os dois complexos. Os valores de  $V_{m\acute{a}x*}$  com a pectina também foram semelhantes àqueles obtidos com o ácido poligalacturônico para ambos complexos enzimáticos. Isso sugere que ambos os complexos enzimáticos possuem as enzimas necessárias para a despolimerização de regiões de homopoligalacturonana, assim como as enzimas com ação específica nas regiões ramificadas e com outros açúcares que não o ácido D-galacturônico.

Para cada complexo, o valor de  $K_{M*}$  para o ácido poligalacturônico foi menor que o valor para a pectina cítrica, mostrando que a afinidade dos complexos enzimáticos pelo ácido poligalacturônico é maior do que a afinidade pela pectina. Isso indica que ambos complexos possuem uma atividade maior de enzimas que atuem na cadeia de HG do que de enzimas auxiliares que irão atuar especificamente nas outras subestruturas da pectina, como a RG-I, RG-II, XG e AG-I. Valores de  $K_{M*}$  já foram relatados na literatura para o complexo A: o valor de 2,7 g L<sup>-1</sup> obtido no presente trabalho é semelhante ao valor de 3,5 g L<sup>-1</sup> para a degradação da pectina cítrica (BACIU e JÖRDENING, 2004), mas bem inferior ao valor de 19,8 g L<sup>-1</sup> para a degradação do resíduo cítrico completo (KHAMSEH e MICCIO, 2011).

No caso do ácido poligalacturônico como substrato, os únicos trabalhos na literatura de caracterização cinética envolvem enzimas isoladas e não complexos enzimáticos. Portanto, não é possível comparar os parâmetros que foram obtidos com ácido poligalacturônico como substrato com a literatura.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS POR COMPLEXOS DE PECTINASES

A degradação de três substratos pécticos, o ácido poligalacturônico, a pectina cítrica isolada e uma pectina cítrica de grau alimentício, foi caracterizada de diversas formas. Em um primeiro momento, foi caracterizado o início da reação pela liberação de pontas redutoras e de ácido D-galacturônico ao longo do tempo. Após isso, a reação foi caracterizada por maior tempo, com o intuito de determinar a conversão máxima dos substratos a pontas redutoras e ácido D-galacturônico.

### 5.2.1. Caracterização do início da reação de degradação enzimática de substratos pécticos

Para caracterizar o início da degradação enzimática de substratos pécticos, foram conduzidas reações de até 37 min, com o complexo A e o complexo N, em um reator encamisado. O ensaio foi conduzido a 30°C, com pH 4,5 e iniciando com 5 g L<sup>-1</sup> de substrato.

As concentrações dos complexos enzimáticos adicionados às reações foram estabelecidas com o intuito de obter resultados semelhantes na degradação do ácido poligalacturônico (Figura 10A). Mesmo com esta padronização, os perfis de degradação obtidos com os dois complexos para os outros substratos foram diferentes. Os perfis obtidos com o complexo N na degradação da pectina cítrica isolada e da pectina de grau alimentício se mantiveram acima daqueles obtidos com o complexo A.

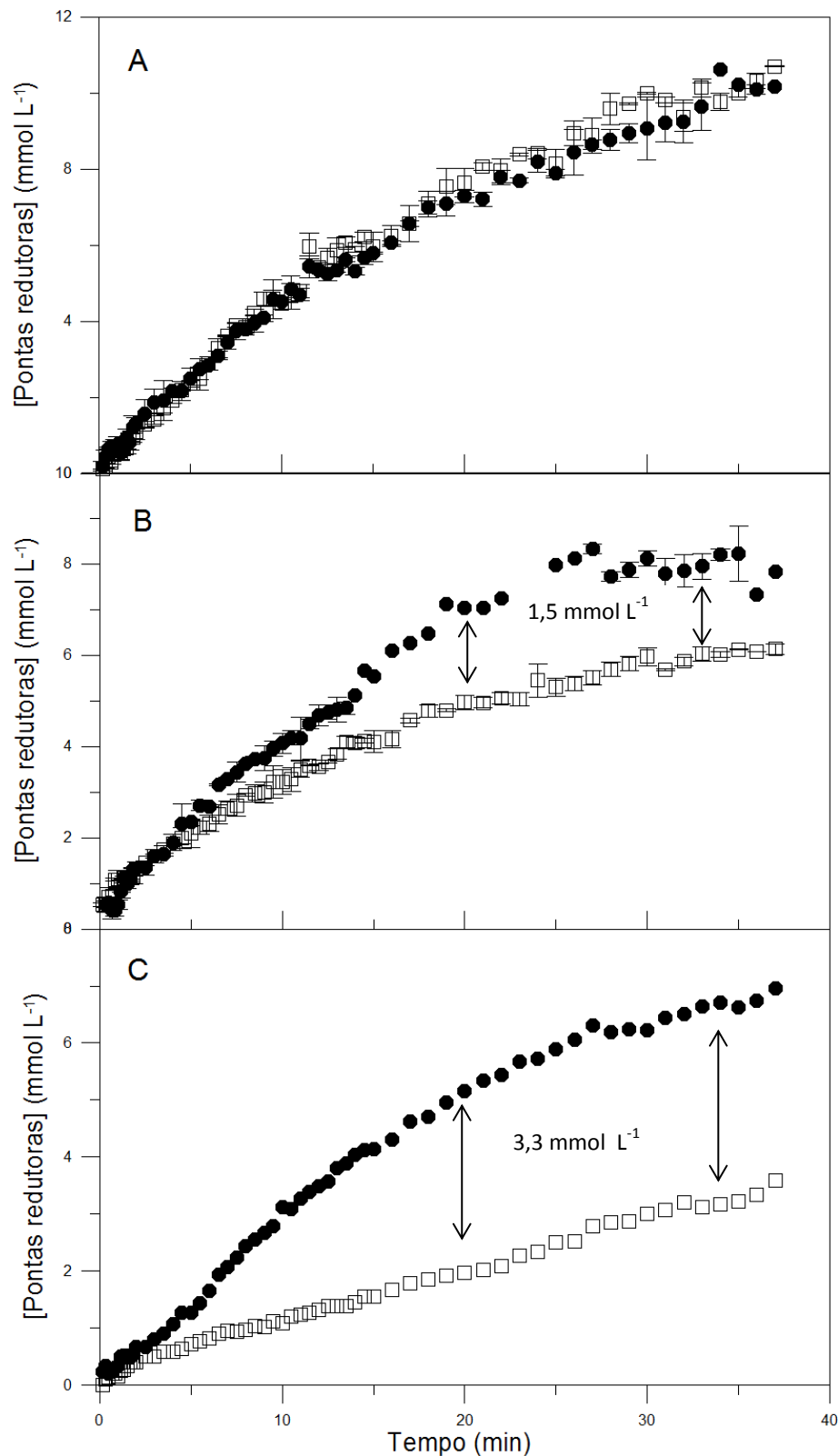


FIGURA 10 – PERFIS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS EM ATÉ 37 MIN.

(A) Ácido poligalacturônico; (B) pectina cítrica isolada e (C) pectina cítrica de grau alimentício.

Reações com monitoramento de pontas redutoras liberadas por DNS, catalisadas pelo (●) complexo N e pelo (□) complexo A. Todas as reações ocorreram a  $30^{\circ}\text{C}$  e em pH 4,5.

Fonte: O Autor (2013).



A diferença se tornou aparente nos primeiros 20 min, essa diferença se manteve quase constante no período de 20 a 37 min. Quanto mais complexo o substrato, maior foi a diferença no desempenho das preparações enzimáticas neste período:  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  para a pectina isolada (Figura 10B) e  $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$  para a pectina de grau alimentício (Figura 10C). Uma possível explicação para as diferenças entre os perfis obtidos é que o complexo N contenha uma diversidade maior de enzimas, incluindo enzimas que atuem em regiões mais complexas, como a ramnogalacturonana I e II. Já foi observado que uma maior diversidade de enzimas pectinolíticas permite a sobrevivência de microrganismos em meios que contenham substâncias pécticas (BENOIT *et al.*, 2012).

Quase todos os perfis na Figura 10 apresentaram uma desaceleração significativa ao redor dos primeiros 10 min da reação: a velocidade média durante o período de 20 a 37 min foi bem menor do que a velocidade inicial (TABELA 4). É importante notar que a reação estava menos do que 30% completa em 20 min (considerando o rendimento máximo teórico de pontas redutoras de  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , correspondente à concentração inicial de substrato de  $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Esta desaceleração brusca também é apontada por Biz *et al.* (2013) para a degradação de substratos pécticos por extratos brutos enzimáticos e por Bonnin *et al.* (2001) para a hidrólise de ácido poligalacturônico por uma endopoligalacturonase. A desaceleração também pode ser observada nos resultados de Baciú e Jördening (2004), que utilizaram o complexo enzimático Pectinex 100L da Novozymes para degradar a pectina cítrica isolada, apesar de os autores não discutirem este fenômeno.

Após esta desaceleração brusca inicial, a velocidade de reação continua a decair, mas com uma desaceleração mais suave. Então, são evidentes duas desacelerações: uma desaceleração brusca no início, que, daqui para frente será denotada “desaceleração inicial”, e uma desaceleração suave prolongada ao longo de todo o resto da reação.

Na comparação entre os complexos utilizados, a velocidade inicial obtida com complexo N é maior do que aquela obtida com o complexo A. Para o ácido poligalacturônico como substrato, as velocidades obtidas com os dois complexos são iguais depois da desaceleração inicial (TABELA 4). Para a

pectina como substrato, a desaceleração obtida com complexo N foi muito maior do que a desaceleração obtida com complexo A. Para ambos os complexos, a desaceleração obtida com pectina foi muito maior do que a desaceleração obtida com ácido poligalacturônico de maneira que a velocidade em 20 min para ácido poligalacturônico foi maior do que aquela para pectina.

TABELA 4 - VELOCIDADES DE DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA E ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO NO INÍCIO DA REAÇÃO E APÓS 20 MINUTOS DE REAÇÃO.

Complexo enzimático	Substrato	$v_0$ (mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )*	$v_{20}$ (mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )*
Complexo A	Pectina cítrica	0,46	0,10
	Ácido poligalacturônico	0,54	0,20
Complexo N	Pectina cítrica	0,74	0,05
	Ácido poligalacturônico	0,72	0,20

\*As velocidades iniciais ( $v_0$ ) foram calculadas a partir de tangentes dos perfis de reação, até 5 min após o início. As velocidades em 20 min ( $v_{20}$ ) foram calculadas a partir de retas ajustadas no intervalo de 20 a 37 min.

Fonte: O Autor (2013).

A concentração de ácido D-galacturônico reflete principalmente a contribuição das exopectinases na reação. Considerando-se a disponibilidade máxima de ácido D-galacturônico de 24 mmol L<sup>-1</sup> para ácido poligalacturônico como substrato (ácido poligalacturônico com 94% de pureza, segundo o fabricante) e de 19 mmol L<sup>-1</sup> para pectina cítrica como substrato (a pectina cítrica utilizada contém pelo menos 74% de ácido D-galacturônico, segundo o fabricante). O grau de sacarificação de um substrato é a quantidade de ácido D-galacturônico liberado dividida pela quantidade de resíduos de ácido D-galacturônico contidos no substrato inicial. Em 20 min, os graus de sacarificação chegaram respectivamente, para os complexos A e N em 5 e 10% para o ácido poligalacturônico e em 1 e 8% para pectina cítrica (FIGURA 11A e B). Então, a liberação de ácido D-galacturônico ainda está longe de estar completa em vinte minutos.

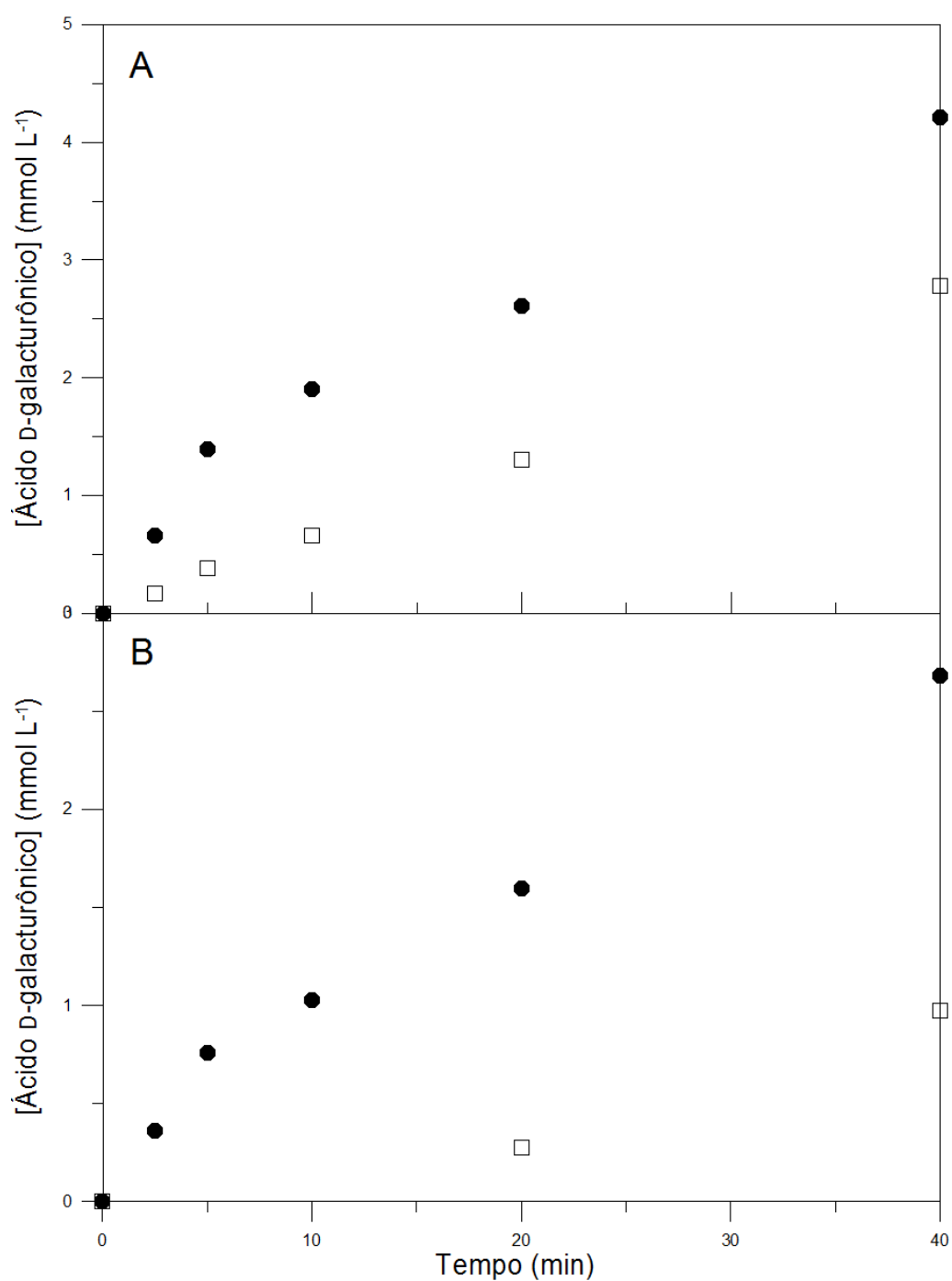


FIGURA 11 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO EM 40 MIN. (A) Ácido poligalacturônico e (B) pectina cítrica isolada. Reações com quantificação de ácido D-galacturônico liberado pelo método de CLAE catalisadas pelo (●) complexo N e pelo (□) complexo A. Todas as reações ocorreram a 30°C e em pH 4,5. Fonte: O Autor (2013).

### 5.2.2. Caracterização da degradação enzimática de substratos pécticos em tempos prolongados

A degradação dos substratos pécticos foi monitorada por um período de até 72 h, para determinar o maior grau de degradação dos substratos obtida com os dois complexos enzimáticos. Nestes ensaios, foram determinados a liberação de pontas redutoras e de ácido D-galacturônico (FIGURA 12).

A liberação máxima de ácido D-galacturônico ocorreu em 24 h para todas as reações. Os rendimentos de ácido D-galacturônico obtidos para os dois complexos com mesmo substrato foram semelhantes: aproximadamente 18 mmol L<sup>-1</sup> para o ácido poligalacturônico (FIGURA 12A), aproximadamente 16 mmol L<sup>-1</sup> para a pectina cítrica isolada (FIGURA 12B) e aproximadamente 13 mmol L<sup>-1</sup> para a pectina de grau alimentício (FIGURA 12C). O desempenho semelhante dos complexos enzimáticos, na liberação de ácido D-galacturônico pela degradação total de ambos os substratos, pode ser atribuído à possibilidade de ambos complexos enzimáticos possuírem a diversidade de enzimas com atividade necessária para a degradação de diferentes substratos pécticos. Então, apesar de no início da reação o complexo N ser mais eficiente que o complexo A, após o tempo necessário para a liberação máxima de ácido D-galacturônico, ambos complexos conseguem atingir o mesmo rendimento.

A concentração de pontas redutoras foi consistentemente mais alta do que a concentração de ácido D-galacturônico, isso evidencia a presença no meio reacional de outros monômeros, como a arabinose, ramnose e glucose, e também de oligossacarídeos recalcitrantes. Isso foi observado inclusive para a degradação do ácido poligalacturônico e, neste caso, sabe-se que as pontas redutoras são devidas somente ao ácido D-galacturônico e oligômeros recalcitrantes de resíduos de ácido D-galacturônico. Isso não é surpreendente, uma vez que já foi demonstrado que oligômeros de ácido D-galacturônico contendo grupos acetilados ou metilados são recalcitrantes (LEIJDEKKERS *et al.*, 2012).

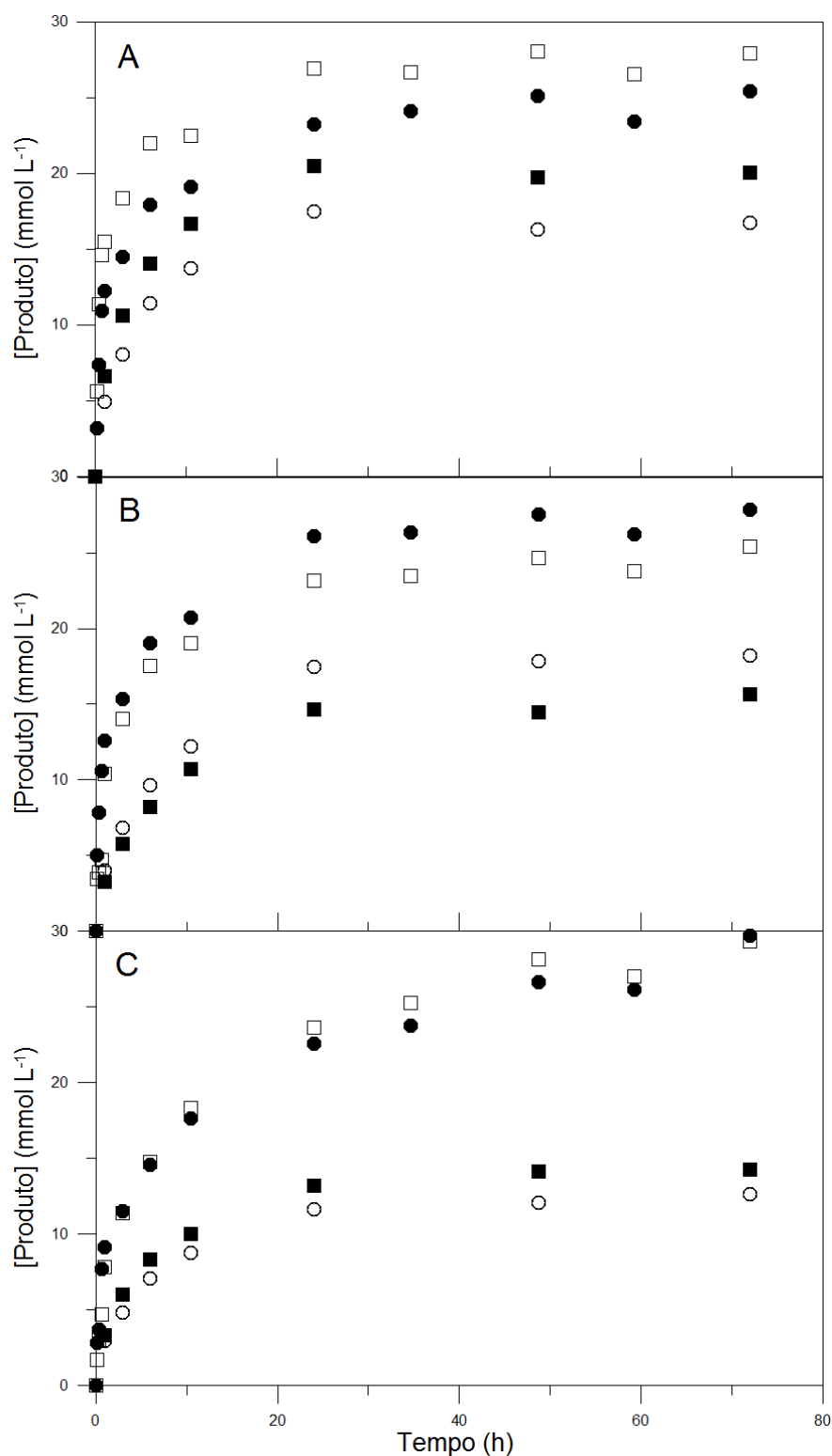


FIGURA 12 - PERFIS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS EM 72 h.

(A) Ácido poligalacturônico; (B) pectina cítrica isolada e (C) pectina cítrica de grau alimentício. Reações com monitoramento de pontas reductoras liberadas por DNS, catalisadas pelo (●) complexo N e pelo (□) complexo A. Reações com quantificação de ácido D-galacturônico liberado pelo método de CLAE catalisadas pelo (○) complexo N e pelo (■) complexo A. Todas as reações ocorreram em 30°C e pH 4,5.

Fonte: O Autor (2013).

### 5.3. IDENTIFICAÇÃO DA CAUSA PARA A DESACELERAÇÃO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO

Como foi mostrado na seção 5.2.1, há uma desaceleração significativa na velocidade da liberação de açúcares redutores durante os primeiros 10 min da reação. Uma desaceleração semelhante ocorre no caso da degradação da celulose por celulasas e várias hipóteses foram sugeridas para explicá-la: a inibição pelo produto, a parada de algumas enzimas após uma fase de *burst* e a falta de substrato disponível para a ação das enzimas no complexo. Nas subseções que seguem, estas várias possibilidades são investigadas. Primeiramente, foi feito um ensaio para assegurar que a desaceleração não era um artefato, resultante da desativação térmica das enzimas. Após serem descartadas todas estas possibilidades, foi determinada a distribuição do tamanho dos oligômeros ao longo da reação. Isto deu base para a criação de uma nova hipótese que explica a desaceleração, apresentada na seção 5.4.

#### 5.3.1. Grau de desnaturação térmica ao longo da reação

Para determinar se a desaceleração inicial poderia ser causada pela desnaturação térmica dos complexos enzimáticos, estes complexos foram pré-incubados na temperatura da reação, 30°C, com consecutivo ensaio da atividade pectinolítica.

Ambos os complexos enzimáticos mantiveram sua atividade durante a primeira hora de incubação (FIGURA 13A), mostrando que a desnaturação não é a causa da desaceleração que ocorre nos primeiros 10 min. No caso de uma incubação mais longa, o complexo N perdeu aproximadamente 50% de sua atividade em 54 h, enquanto o complexo A se manteve estável (FIGURA 13B). Portanto, no caso do complexo N, a perda de atividade pode contribuir para a desaceleração contínua que ocorre após os primeiros 10 min de reação.

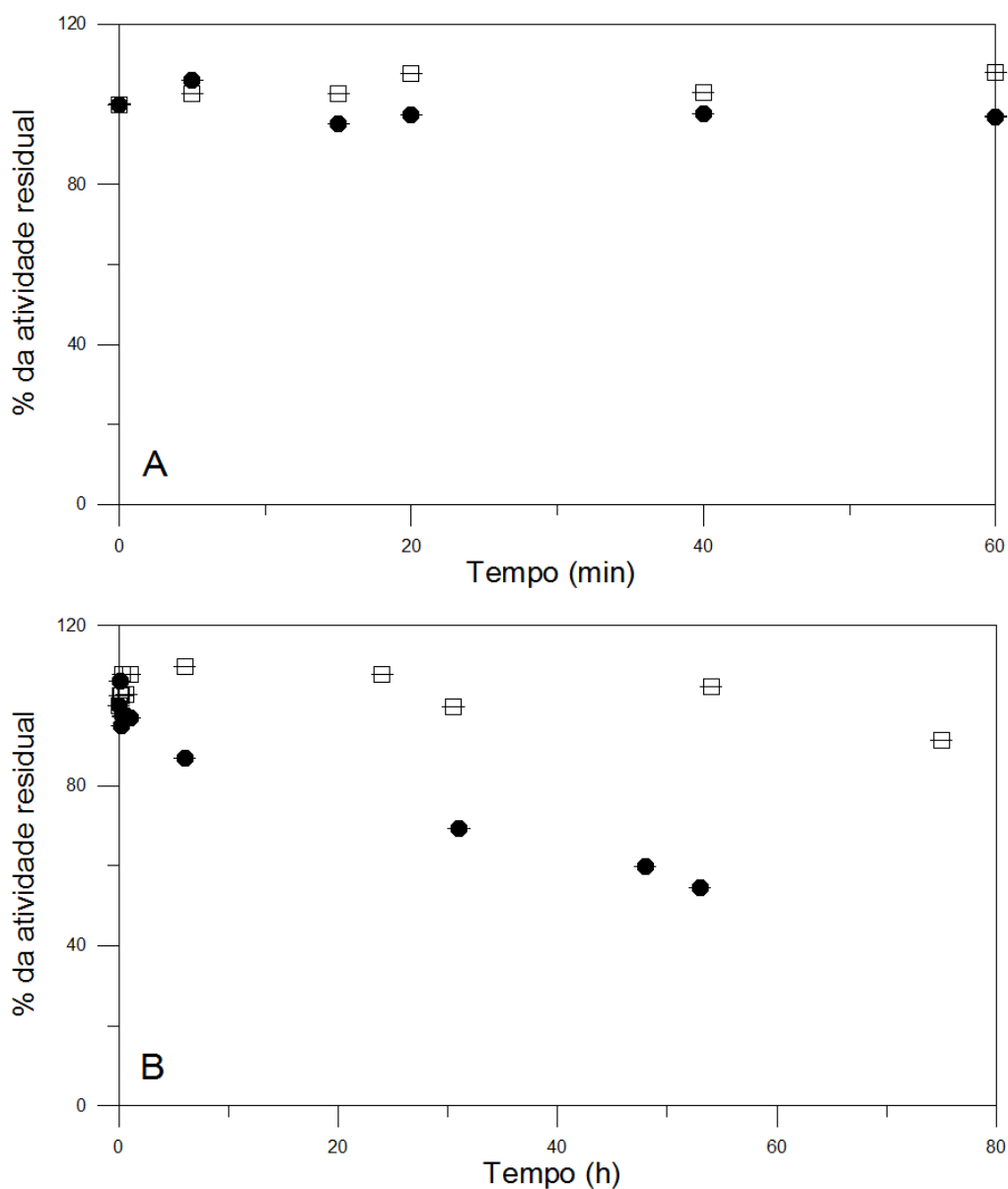


FIGURA 13 - ESTABILIDADE À TEMPERATURA DE ENSAIO, 30°C.

Estabilidade em (A) até 1 h e (B) até 72 h de ensaio. Após a incubação, foram realizados ensaios de atividade pectinolítica com o (●) complexo N e com o (□) complexo A. Os ensaios de atividade pectinolítica tiveram foram feitos a 30°C em pH 4,5 por 20 min, com determinação das pontas redutoras formadas pelo método de DNS.

Fonte: O Autor (2013).

### 5.3.2. Caracterização da inibição das hidrolases nos complexos de pectinases pelo produto

Vários autores mostraram que inibição pelo produto ocorre no complexo pectinolítico e em algumas enzimas isoladas (KESTER *et al.*, 1996; BACIU e JÖRDENING, 2004; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; ALAM *et al.*, 2011; KHAMSEH

e MICCIO, 2012; MERTENS, 2013). Entretanto, uma vez que os estudos que caracterizaram a inibição para os complexos enzimáticos não caracterizaram bem o início da reação, ainda não foi determinada se a inibição pelo produto é a causa da desaceleração inicial.

Para investigar esta possibilidade, foram realizados ensaios com a adição de ácido D-galacturônico ao meio reacional antes de iniciar a reação. As concentrações de ácido D-galacturônico usadas nestes ensaios foram iguais às concentrações de pontas redutoras, presentes nos tempos de 20 min e 37 min, nos perfis correspondentes mostrados na Figura 10. Nestes dois tempos, a velocidade da reação já havia desacelerado significativamente em relação à velocidade inicial.

A adição de ácido D-galacturônico no início da reação teve um efeito negligenciável no perfil ao longo dos 37 min do ensaio (FIGURA 14 e 15), comprovando que a inibição pelo produto não é o único fator responsável pela desaceleração inicial. Se a inibição fosse o único fator, a velocidade inicial dos ensaios realizados com a adição de ácido D-galacturônico não seria maior do que a velocidade no tempo correspondente (20 ou 37 min) no ensaio controle feito sem a adição de ácido D-galacturônico. Como as Figura 14 e 15 mostram, as velocidades iniciais obtidas nos ensaios com a adição de ácido D-galacturônico no tempo zero eram bem superiores às velocidades obtidas depois da desaceleração inicial no ensaio controle.

Também foi realizado um ensaio para a degradação do ácido poligalacturônico pelas pectinases do complexo N com uma concentração inicial de ácido D-galacturônico de 20,6 mmol L<sup>-1</sup>. Neste ensaio, a velocidade inicial não foi afetada, mas a desaceleração prolongada da velocidade ocorreu mais cedo, de maneira que o perfil ficou abaixo dos outros perfis (FIGURA 15B).

Dessa forma, a inibição pelo produto ocorre durante a degradação de substratos pécticos e este fenômeno contribui para a contínua desaceleração que ocorre ao longo de períodos longos, como mostrado por vários autores (BACIU e JÖRDENING, 2004; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; KHAMSEH e MICCIO, 2011). Contudo, esta inibição pelo produto tem relativamente pouco



efeito no início da reação e certamente não explica a desaceleração significativa que ocorre nos primeiros minutos.

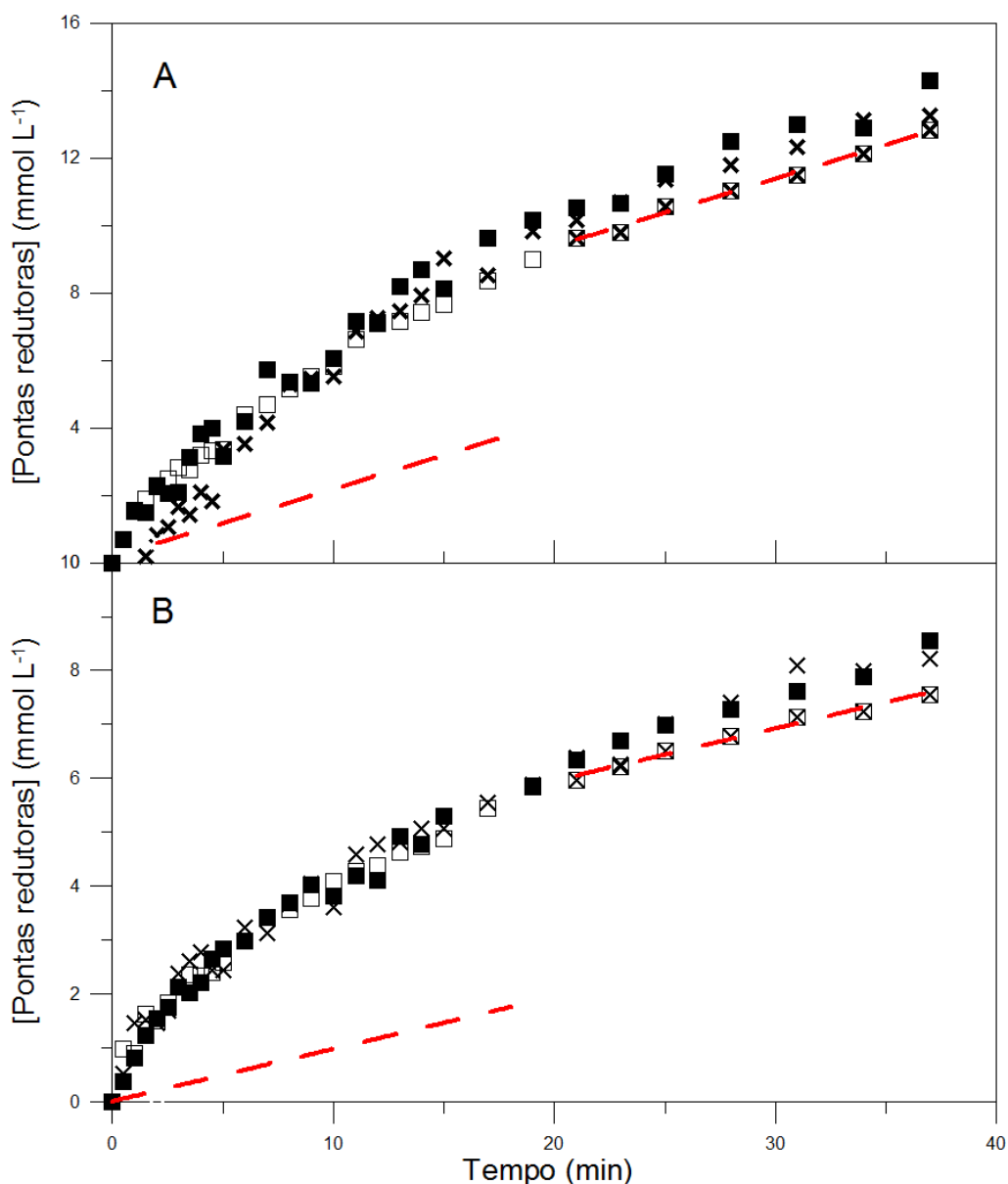


FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PRODUTO AO INÍCIO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO A.

Degradação (A) do ácido poligalacturônico e (B) da pectina cítrica isolada. ( $\square$ ) Controle da reação, sem adição de ácido D-galacturônico; ( $\blacksquare$ ) reação com adição de ácido D-galacturônico igual à concentração de pontas redutoras no ensaio controle em 20 min, 8  $\text{mmol L}^{-1}$  para o ácido poligalacturônico e 5  $\text{mmol L}^{-1}$  para a pectina e ( $\times$ ) reação com adição de ácido D-galacturônico igual à concentração de pontas redutoras no ensaios controle em 37 min, 11  $\text{mmol L}^{-1}$  para o ácido poligalacturônico e 6  $\text{mmol L}^{-1}$  para a pectina. (---) As linhas pontilhadas representam a inclinação da curva controle em 20 min e sua transposição para o tempo zero. Todas as reações ocorreram a 30°C, em pH 4,5 e tiveram sua concentração de pontas redutoras monitorada pelo método de DNS.

Fonte: O Autor (2013).

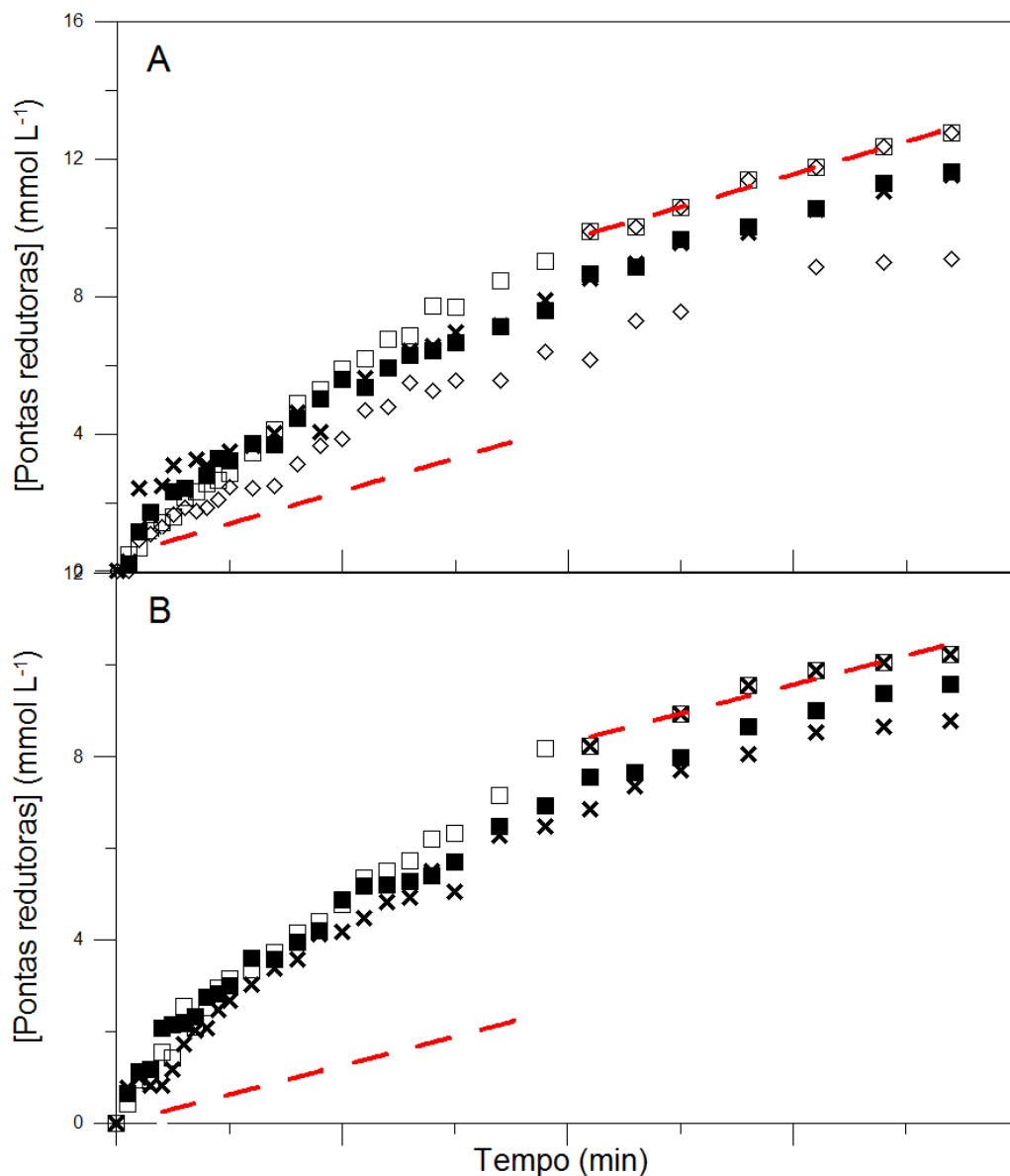


FIGURA 15 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PRODUTO AO INÍCIO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO N.

Degradação (A) do ácido poligalacturônico e (B) da pectina cítrica isolada. (□) Controle da reação, sem adição de ácido D-galacturônico; (■) reação com adição ácido D-galacturônico igual à concentração de pontas redutoras no ensaio controle em 20 min, 7 mmol L<sup>-1</sup> para o ácido poligalacturônico e para a pectina; (X) reação com adição de ácido D-galacturônico igual à concentração de pontas redutoras no ensaio controle em 37 min, 10 mmol L<sup>-1</sup> para o ácido poligalacturônico e 8 mmol L<sup>-1</sup> para a pectina e (Δ) reação com adição de 20,6 mmol L<sup>-1</sup> de ácido D-galacturônico. (---) As linhas pontilhadas representam a inclinação da curva controle em 20 min e sua transposição para o tempo zero. Todas as reações ocorreram a 30°C, em pH 4,5 e tiveram sua concentração de pontas redutoras monitorada pelo método de DNS.

Fonte: O Autor (2013).

### 5.3.3. Efeito do aumento da concentração inicial de enzimas

Como foi mostrado no item 2.5.2, a desaceleração inicial que ocorre no caso das celulasas se deve ao fenômeno de *burst*, que, por sua vez, advém da existência de duas fases na ação das celulasas (JALAK e VÄLJAMÄE, 2010; MURPHY *et al.*, 2012; PRAESTGAARD *et al.*, 2011), a primeira fase consiste na rápida liberação de produto, podendo ser processiva, no caso da celobiohidrolases, ou não processiva, no caso das endoglucanases, e a segunda fase consiste na estagnação destas enzimas em determinadas estruturas da celulose, o que ocasiona a desaceleração na velocidade de reação. Uma vez que também há uma desaceleração inicial na degradação de substratos pécticos por pectinases, e existem também enzimas processivas nos complexos de pectinases (PAGES *et al.*, 2001; PARENICOVÁ *et al.*, 2000a; PARENICOVÁ *et al.*, 2000b), foi considerada a possibilidade de a desaceleração inicial observada no presente trabalho ocorrer pela parada temporária das pectinases ao encontrarem regiões com ácido D-galacturônico esterificado ou ramificações na cadeia.

Foram realizados ensaios com uma concentração inicial maior do complexo N (2×, 4× e 6× da concentração normalmente utilizada), utilizando a pectina cítrica como substrato. Conforme a concentração de enzima aumentou a velocidade inicial de degradação da pectina também aumentou (FIGURA 16 e 17), mas em todos os ensaios a velocidade foi reduzida a quase o mesmo valor após alguns minutos de reação (FIGURA 17).

Se a desaceleração inicial se devesse ao fenômeno de *burst*, tanto as velocidades na fase pós-desaceleração quanto os interceptos obtidos pela extrapolação das linhas de tendência mostradas na Figura 18 (denotados: Intercepto [P]) seriam diretamente proporcionais à concentração de complexo adicionado ao ensaio. Uma vez que isto não aconteceu (FIGURA 18), a desaceleração inicial da reação não se deve ao fenômeno de cinética de fase de *burst*.

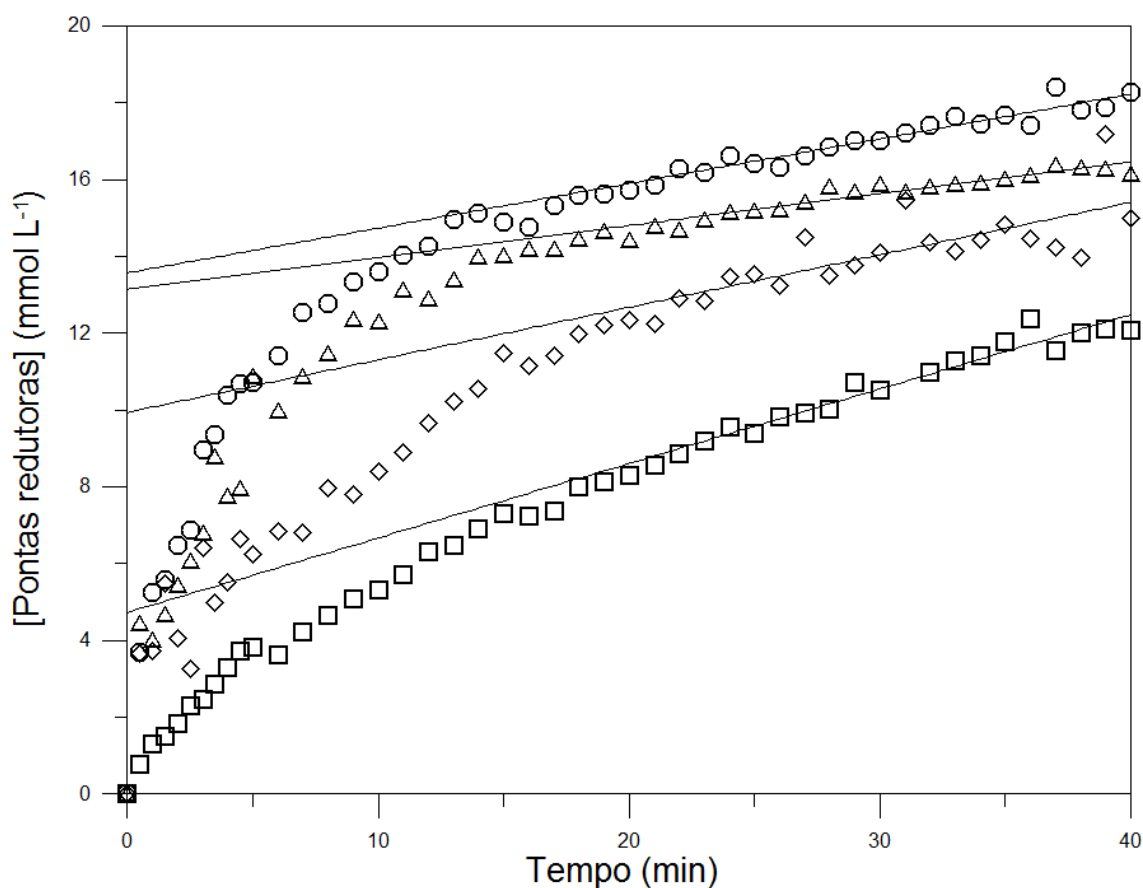


FIGURA 16 - DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA ISOLADA POR DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO N.

Nestes ensaios, (□) o controle foi o ensaio com a concentração usual do complexo, 1,65 mg de proteínas do complexo enzimático por litro de meio reacional. Foram realizadas reações com concentrações de (◇) 3,29 mg L<sup>-1</sup> ("2x"), (Δ) 6,58 mg L<sup>-1</sup> ("4x"), e (○) 9,87 mg L<sup>-1</sup> ("6x"). Todas as reações foram monitoradas através da liberação de pontas redutoras pelo método de DNS. As retas são linhas de tendência para o período de 21 a 40 min, ou seja, para o período após a desaceleração inicial da reação.

Fonte: O Autor (2013).

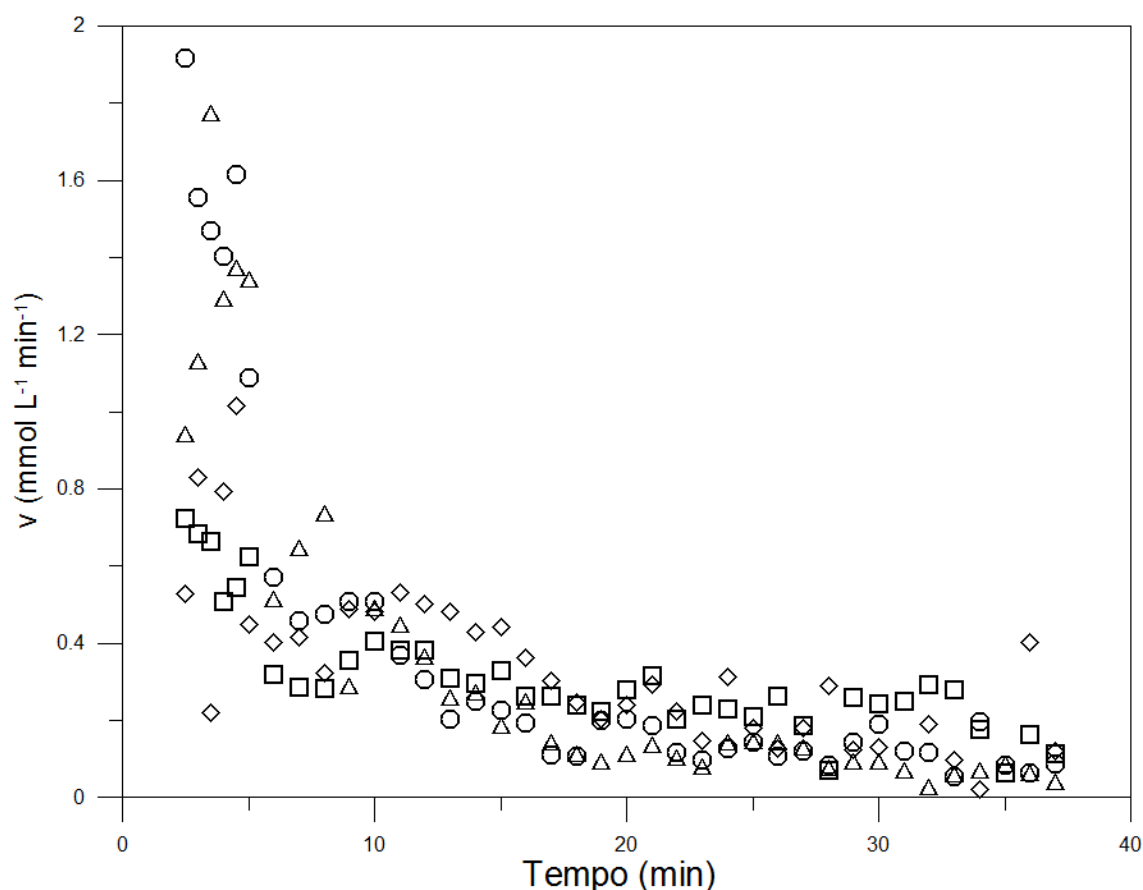


FIGURA 17 - VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE PONTAS REDUTORAS DURANTE A DEGRADAÇÃO DE PECTINA CÍTRICA ISOLADA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Nestes ensaios, (□) o controle foi o ensaio com a concentração usual do complexo, 1,65 mg de proteínas do complexo enzimático por litro de meio reacional. Foram realizadas reações com concentrações de (◇) 3,29 mg L<sup>-1</sup> ("2x"), (Δ) 6,58 mg L<sup>-1</sup> ("4x"), e (○) 9,87 mg L<sup>-1</sup> ("6x"). Todas as reações foram monitoradas através da liberação de pontas redutoras pelo método de DNS. As retas são linhas de tendência para o período de 21 a 40 min, ou seja, para o período após a desaceleração inicial da reação.

Fonte: O Autor (2013).

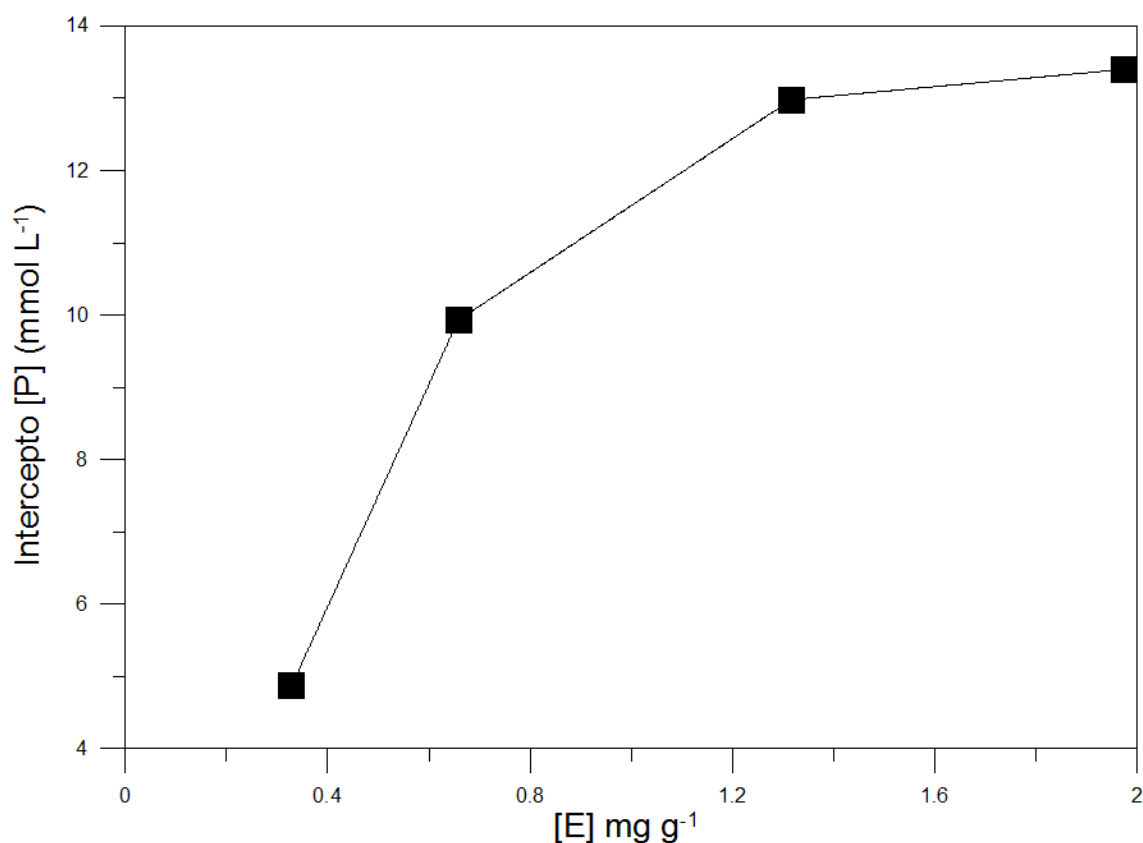


FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO LIBERADO RELACIONADO A CONCENTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.

Esta concentração de produto é obtida pela intersecção da curva de tendência de reação, obtida após a desaceleração inicial da reação, com a ordenada. As curvas de tendência foram obtidas traçadas a partir de 21 minutos de reação.

Fonte: O Autor (2013).

#### 5.3.4. Efeito de nova adição de enzima após a estabilização da velocidade de reação.

A possibilidade de a desaceleração inicial acontecer devida à rápida depleção de substrato facilmente degradável foi considerada com base na estrutura de pectina: as regiões de homopoligalacturonana não esterificada são mais fáceis de degradar e, depois de alguns minutos, poderiam restar somente as subestruturas que mais difíceis de degradar, como a homopoligalacturonana esterificada, a ramnogalacturonana e a arabinogalacturonana.

Para testar esta possibilidade, foram realizados experimentos com a adição de uma segunda alíquota do complexo enzimático (com a mesma quantidade de enzimas que a primeira, mas em um volume muito menor) após

20 min de reação decorrida. Isto foi feito com a pectina cítrica isolada, para os dois complexos enzimáticos. Ao ser adicionada a segunda alíquota, o perfil divergiu daquele do experimento controle, com adição de somente uma alíquota no início da reação (FIGURA 19). A velocidade da reação chegou quase à velocidade inicial (FIGURA 20). Isso mostra que, em 20 min, ainda há muito substrato disponível para o ataque enzimático; se não houvesse mais substrato facilmente degradável disponível, então, a velocidade não aumentaria para um valor semelhante à velocidade inicial. Este comportamento é semelhante ao caso das celulasas, onde uma segunda adição de endoglucanases (MURPHY *et al.* 2012) ou celobiohidrolases (PRAESTGAARD *et al.* 2011) leva a um aumento na velocidade para um valor semelhante à velocidade inicial.

No entanto, a velocidade de reação após a aplicação da segunda alíquota dos complexos enzimáticos caiu novamente após alguns minutos (FIGURA 20). Essa nova queda brusca na velocidade mostra que as enzimas recém-adicionadas foram inativadas ou tiveram a sua eficiência diminuída por outros fatores além da depleção de substrato preferencial.

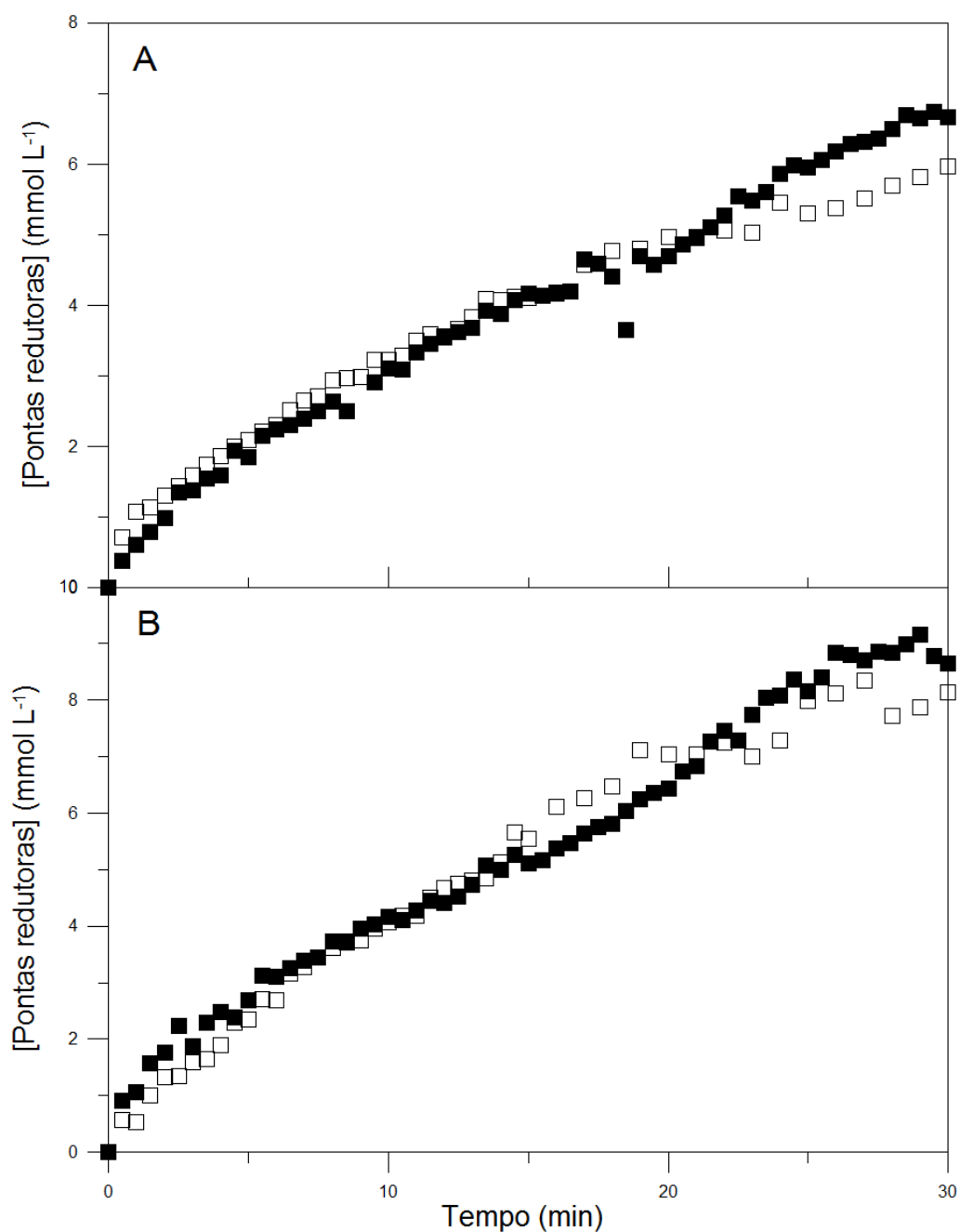


FIGURA 19 - DEGRADAÇÃO DE PECTINA CÍTRICA ISOLADA, COM SEGUNDA APLICAÇÃO DE ENZIMAS.

Ação de (A) complexo A e (B) complexo N. Reação (□) com adição dos complexos somente no início e (■) com adição no início e após vinte minutos. Todas as reações ocorreram a 30°C, em pH 4,5 e tiveram sua concentração de pontas redutoras monitoradas pelo método de DNS  
Fonte: O Autor (2013).



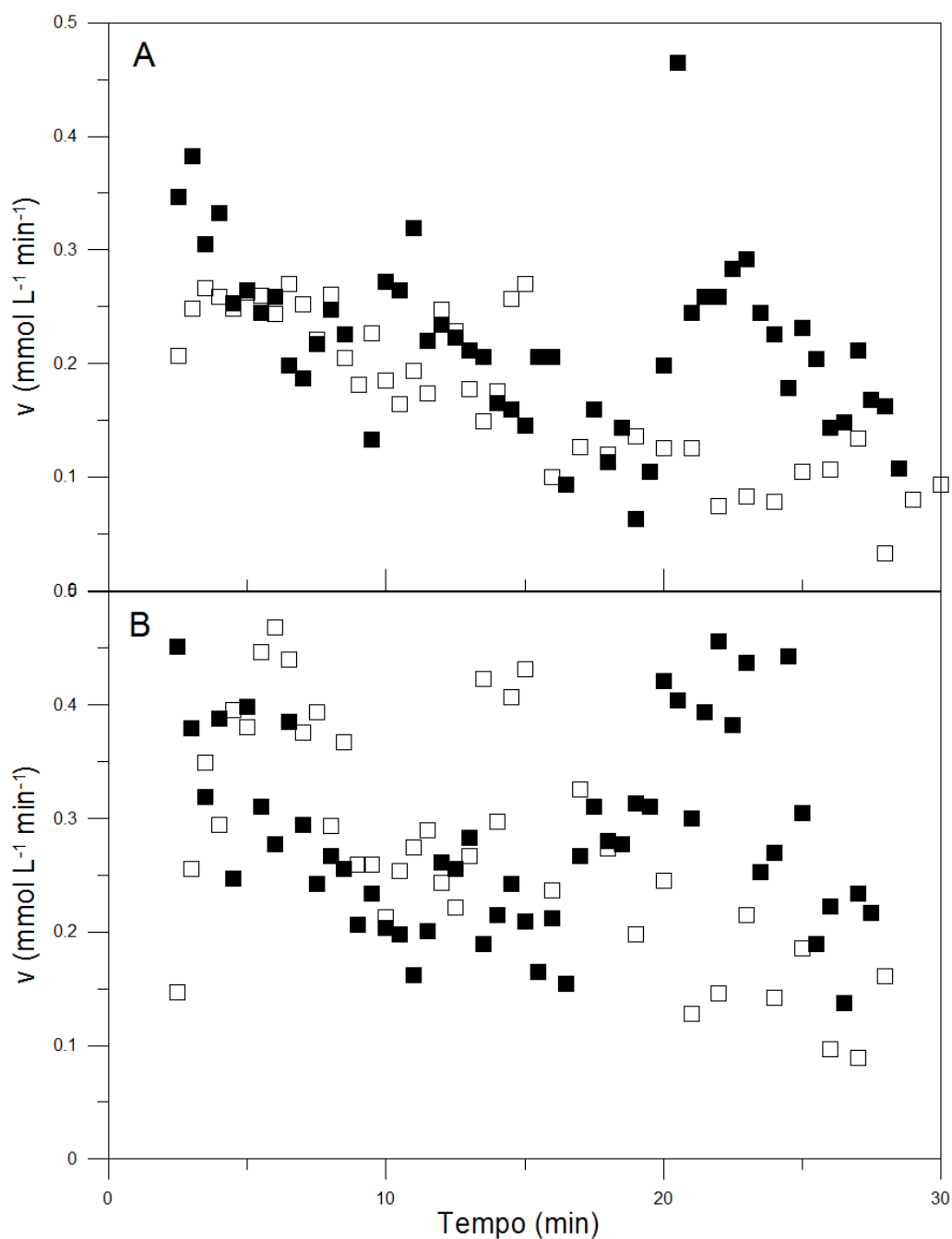


FIGURA 20 – VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE PONTAS REDUTORAS NA DEGRADAÇÃO DA PECTINA CÍTRICA ISOLADA, COM SEGUNDA APLICAÇÃO DE ENZIMAS.

Ação de (A) complexo A e (B) complexo N. Reação (□) com adição dos complexos somente no início e (■) com adição no início e após vinte minutos. Todas as reações ocorreram a 30°C, em pH 4,5 e tiveram sua concentração de pontas redutoras monitoradas pelo método de DNS. O cálculo das velocidades foi realizado por meio de média móvel.

Fonte: O Autor (2013).

### 5.3.5. Caracterização de oligossacarídeos formados ao longo da reação

Para compreender melhor o modo de ação dos complexos de pectinases, as distribuições dos tamanhos dos oligossacarídeos liberados foram determinadas ao longo da reação, tanto para a degradação de pectina cítrica, quanto para a degradação de ácido poligalacturônico. Para este experimento foi usado o complexo N.

O detector de índice de refração do HPSEC-IR detectou um pico correspondente ao substrato original, quando este foi analisado antes da degradação enzimática e, vários picos que correspondem a oligômeros de tamanhos menores. Ao longo das reações, os tamanhos e as posições destes picos mudaram (FIGURA 21). As posições destes picos foram sempre deslocadas para a direita, indicando que os oligômeros ficaram menores conforme a reação prosseguia. Entretanto, não foi possível determinar os tamanhos das moléculas presentes nestes picos porque os oligômeros não foram detectados pelo detector MALLS. Mesmo com essa limitação, ficou claro que, em apenas cinco minutos de reação, ambos os substratos já foram clivados, em grande parte, a oligômeros muito menores, pois o pico correspondente ao substrato original quase desapareceu. Em cinco minutos de reação há somente  $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido D-galacturônico e  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de pontas redutoras liberados (FIGURA 10), então, é possível concluir que a ação das endopoligalacturonases e endoliases é significativa no início da reação.

As endopoligalacturonases diminuem sua eficiência catalítica ( $\frac{k_{cat}}{K_M}$ ) conforme o tamanho dos oligômeros diminui (BENEN *et al.*, 1999; PARENICOVÁ *et al.*, 2000a; BONNIN *et al.*, 2001), então, ao restar somente oligômeros pequenos, a velocidade de reação catalisada pelas endopoligalacturonases tende a diminuir.

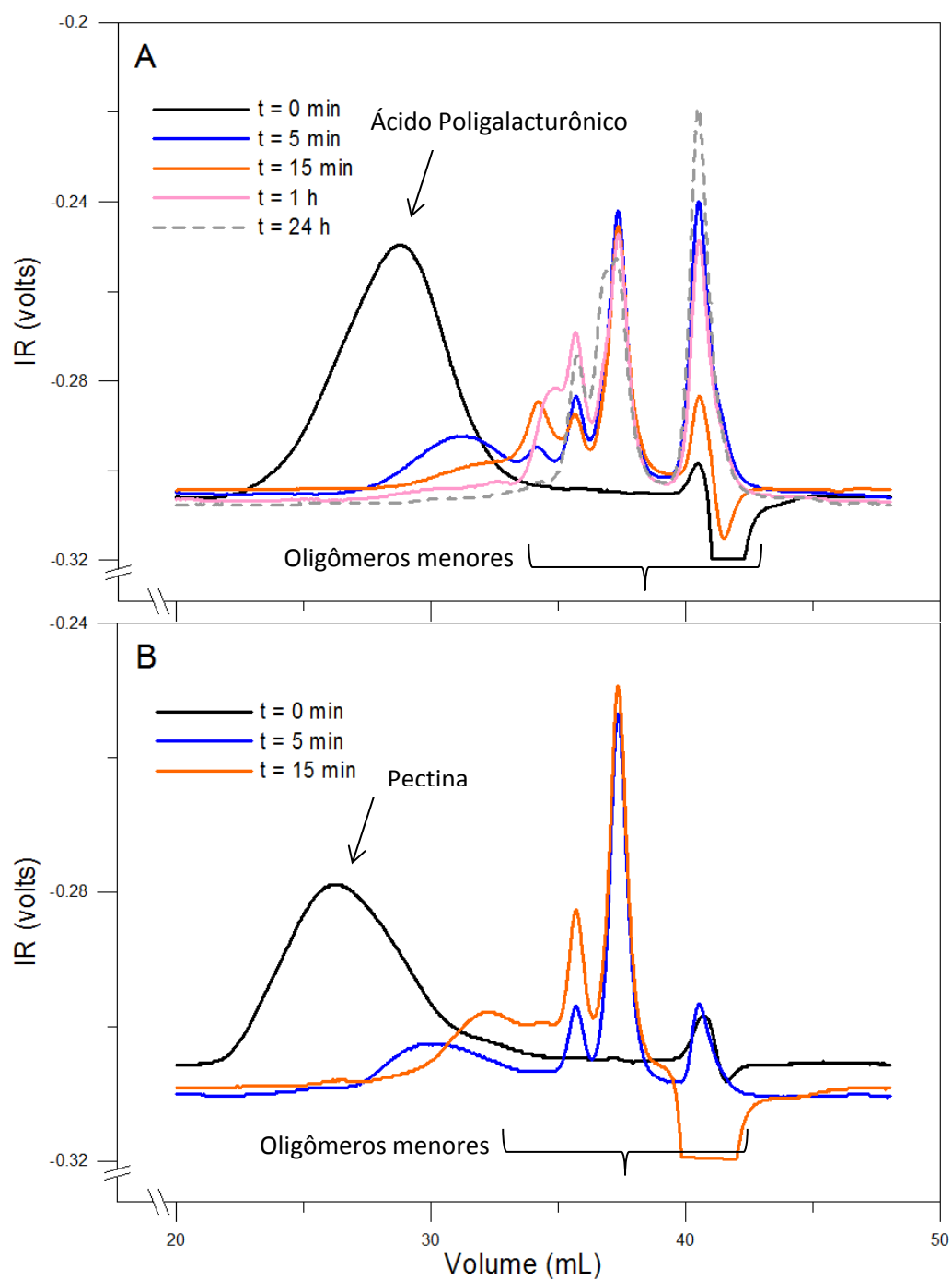


FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE OLIGÔMEROS GERADOS AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO

Degradação do (A) ácido poligalacturônico e da (B) pectina cítrica isolada pelo complexo N. Todos os resultados foram obtidos pelo detector de índice de refração no HPSEC-IR.

Fonte: O Autor (2013).

#### 5.4. MODELO DESCRITIVO DA DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS POR COMPLEXOS DE PECTINASES

A observação da formação dos oligossacarídeos na seção 5.3.5, onde foi mostrado que os polímeros são, na sua maioria, degradados em oligômeros nos primeiros 5 min da reação deu a base para a proposição de um modelo descritivo da degradação de substratos pécticos pelo complexo de pectinases.

A Figura 22 demonstra o modelo: a Figura 22A mostra a pectina, com suas diferentes regiões, com as subestruturas de homopoligalacturonana e ramnogalacturonana I destacadas. Nos primeiros 5 min, há uma ação significativa das endoenzimas, com quebras das ligações glicosídicas sendo feitos em diversos pontos no polímero inicial (FIGURA 22B). A depleção rápida dos polímeros leva à desaceleração inicial na velocidade de liberação de pontas redutoras (FIGURA 22C). Neste momento, a contribuição das exoenzimas fica mais significativa, devido ao aumento de pontas disponíveis no substrato. Então, começa uma etapa prolongada onde a ação das exoenzimas predomina (FIGURA 22D). Durante esta etapa, a ação das exoenzimas depende da liberação de substrato preferencial pelas enzimas auxiliares, como as esterases, ramnogalacturonases e arabinogalacturonases e, além disso, estas exoenzimas sofrem com a inibição pelo produto, ocasionando, assim, a desaceleração contínua na velocidade de reação. Ao alcançar a liberação máxima de ácido D-galacturônico, restam ainda certos oligômeros recalcitrantes e os monossacarídeos liberados (FIGURA 22E).

Este modelo descritivo sugere que a degradação de substratos pécticos segue duas etapas: na primeira etapa, as endoenzimas rapidamente reduzem o polímero para oligossacarídeos (FIGURA 23, intervalo A). Quando o tamanho dos oligossacarídeos reduz significativamente, a velocidade da reação desacelera bruscamente (FIGURA 23, intervalo B). Na segunda etapa da degradação dos substratos pécticos, as exoenzimas são mais atuantes, mas sua atividade é dependente das enzimas auxiliares e sofre com a inibição pelo produto, ocasionando uma desaceleração prolongada (FIGURA 23, intervalo C). Este modelo se assemelha a um modelo matemático proposto para a degradação de amido por  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases (BRANDAM *et al.*, 2003)

que permite prever a atividade das enzimas envolvidas de acordo com as condições do processo e a quantidade de açúcar liberado ao fim do processo. Neste modelo, a ação das  $\alpha$ -amilases predominam no início, mas a velocidade da reação logo é limitada pela baixa atividade das  $\beta$ -amilases da preparação enzimática.

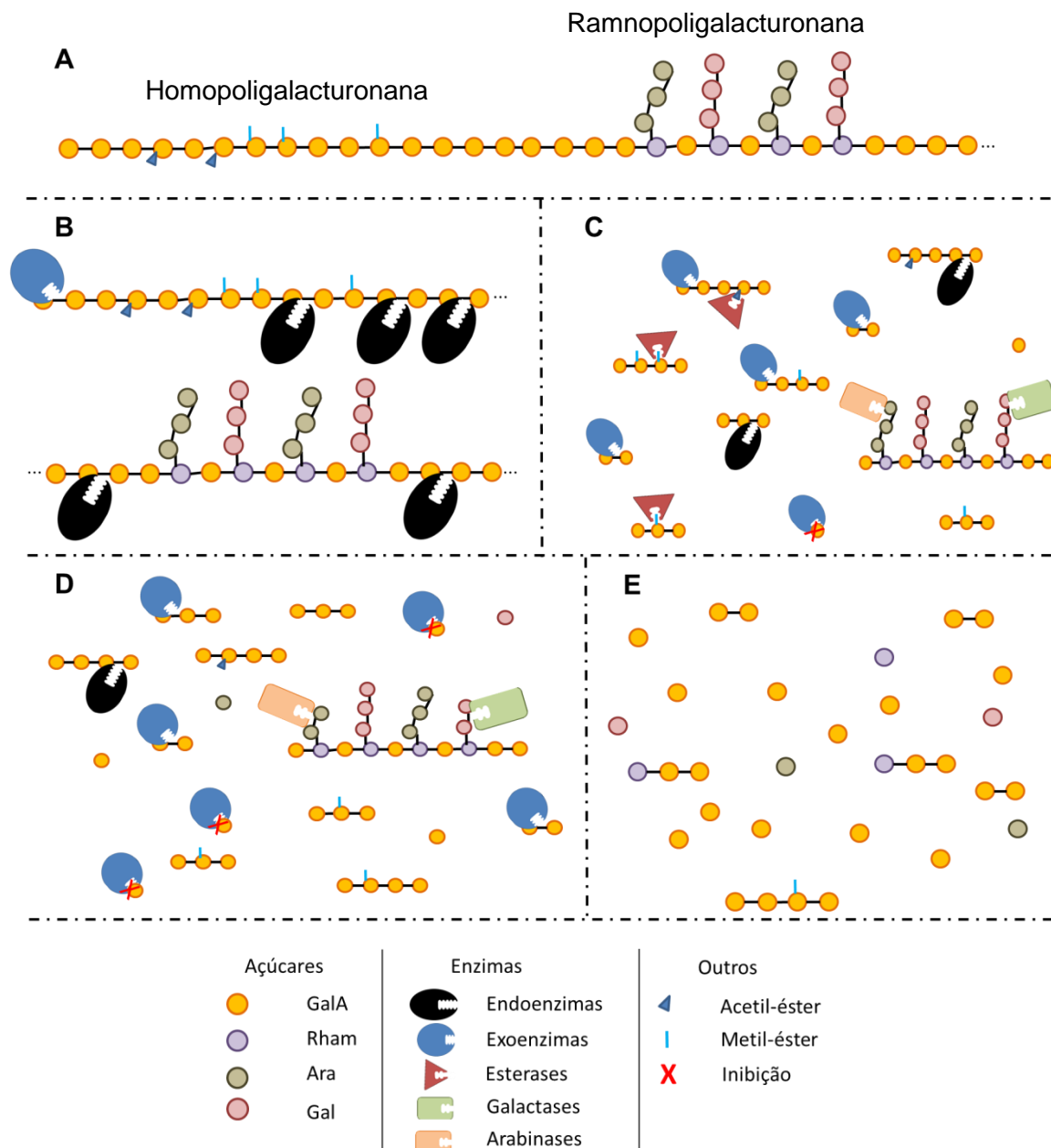


FIGURA 22 - HIPÓTESE SOBRE O MODO DE AÇÃO DAS PECTINASES NA PECTINA.

(A) Estrutura da pectina simplificada, com destaque para as regiões de homopoligalacturonana e ramnopoligalacturonana. (B) Ação das enzimas nos primeiros cinco minutos de degradação, antes da desaceleração da velocidade de reação, onde há uma maior atividade das endoenzimas no substrato. (C) Meio reacional no momento em que ocorre a desaceleração inicial da velocidade de reação, evidenciando a diminuição de substrato para as endoenzimas, e maior ação das exoenzimas e enzimas auxiliares (ramnopoligalacturonases, arabinases, galactases, xilanases e esterases). (D) Segunda etapa da reação enzimática, onde ocorre uma desaceleração prolongada da velocidade de despolimerização, devido à limitação da ação das exoenzimas pela dependência da catalise promovida pelas enzimas auxiliares e pela inibição causada pelo produto. (E) Meio reacional após 24 horas de reação, com alguns oligômeros recalcitrantes restantes e muitos monossacarídeos liberados.

Fonte: O Autor (2013).

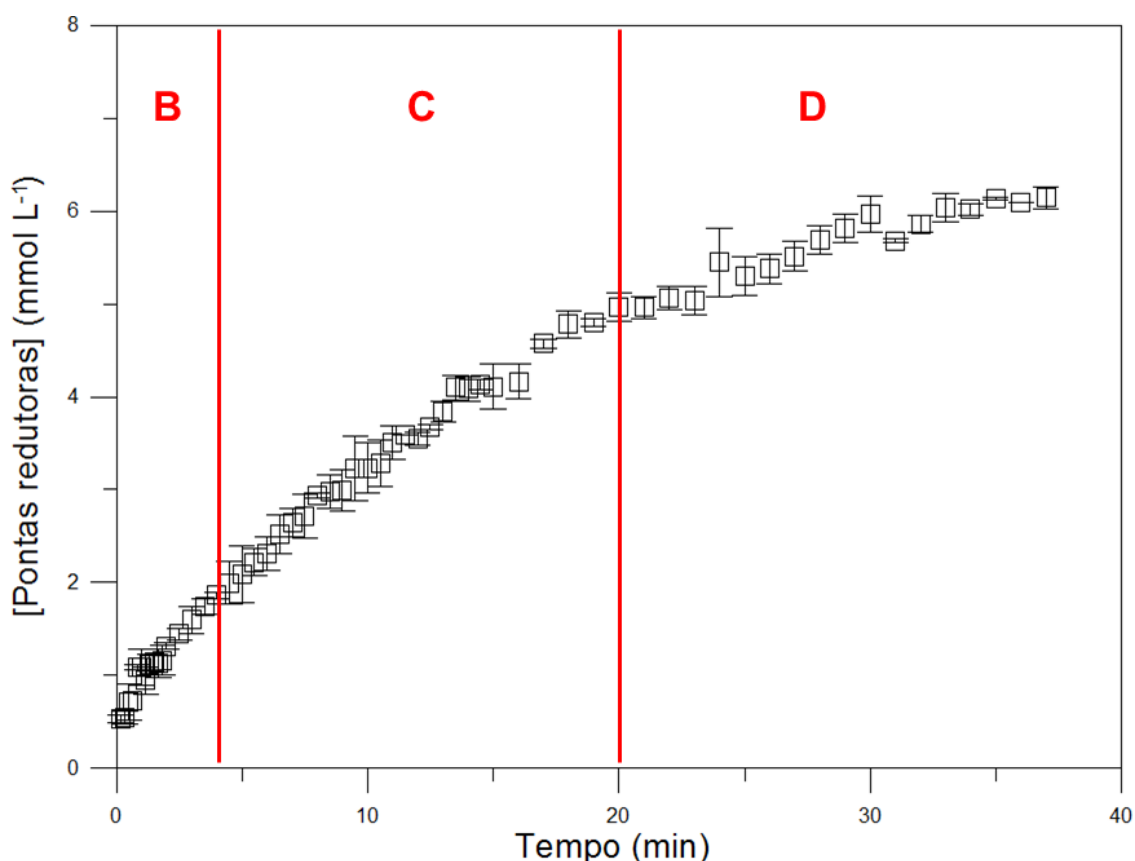


FIGURA 23 - IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DESCRITAS NO MODELO DESCRITIVO PARA A DEGRADAÇÃO DA PECTINA PELO COMPLEXO A.

Os fenômenos predominantes nos intervalos A, B e C são descritos no texto.

Fonte: O Autor (2013).

Várias das propostas do modelo são consistentes com outros resultados deste trabalho e de outros trabalhos sobre a degradação de pectina. Primeiro, a ação significativa dos endopoligalacturonases é consistente com a baixa liberação de ácido D-galacturônico e rápida formação de oligossacarídeos que foram observadas nos itens 5.2.1 e 5.3.5. Segundo, a desaceleração inicial é consistente com a diminuição da eficiência catalítica que ocorre para as endopoligalacturonases com a diminuição do tamanho dos oligômeros (BENEN *et al.*, 1999; PARENICOVÁ *et al.*, 2000a; BONNIN *et al.*, 2001). Terceiro, a desaceleração prolongada na velocidade de reação está de acordo com a necessidade de uma grande variedade de enzimas para que microrganismos possam degradar pectina (ANDERSEN *et al.* 2012; BENOIT *et al.*, 2012). Quarto, no modelo, a inibição pelo produto (ácido D-galacturônico) afeta somente as exoenzimas e, como resultado, o modelo prevê que a inibição pelo

produto será mais importante na segunda etapa quando a ação das exoenzimas predomina. Isto é consistente com o pequeno efeito de inibição na velocidade inicial quando ácido D-galacturônico foi adicionado no início da reação (item 5.3.2) e com a literatura que mostra que várias exopoligalacturonases sofrem deste tipo de inibição (KESTER *et al.*, 1996; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; MERTENS, 2013).

## 5.5. MODELO MATEMÁTICO SIMPLIFICADO DA DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS PÉCTICOS PELOS COMPLEXOS DE PECTINASES

Foi desenvolvido um modelo matemático para demonstrar que o modelo descritivo que foi proposto na seção 5.4 seria capaz de descrever as duas etapas observadas no perfil de liberação de açúcares redutores dos substratos pécticos. As regras deste modelo matemático foram escolhidas para assegurar um sistema simples de equações e não para descrever exatamente como o processo funciona. Adicionalmente, o complexo enzimático no modelo matemático foi tratado de maneira bem simples, com somente duas enzimas, uma endopoligalacturonase e uma exopoligalacturonase. Se fosse proposto um modelo também as esterases, liases, ramnogalacturonases, arabinogalacturonases, galactases e xilogalacturonases, o sistema de equações seria bem complexo.

A Figura 24 mostra o esquema do modelo matemático. Neste esquema, o substrato inicial é um polímero de 100 resíduos de ácido poligalacturônico, sem regiões de metil esterificadas ou acetil esterificadas, representado pelo símbolo  $B$ . As endopoligalacturonases, denotadas  $E_1$ , hidrolisam este polímero para produzir  $N1$  oligômeros de tamanho intermediário, representados pelo símbolo  $M$ . As mesmas endoenzimas hidrolisam os oligômeros de tamanho intermediário para produzir  $N2$  oligômeros de tamanho pequeno, representados pelo símbolo  $S$ . Por sua vez, os oligômeros de tamanho pequeno são hidrolisados pelos exopoligalacturonases, denotadas  $E_2$ , produzindo  $N3$  moléculas de ácido D-galacturônico, representados pelo símbolo  $P$ . Estas exoenzimas sofrem com a inibição competitiva pelo produto.



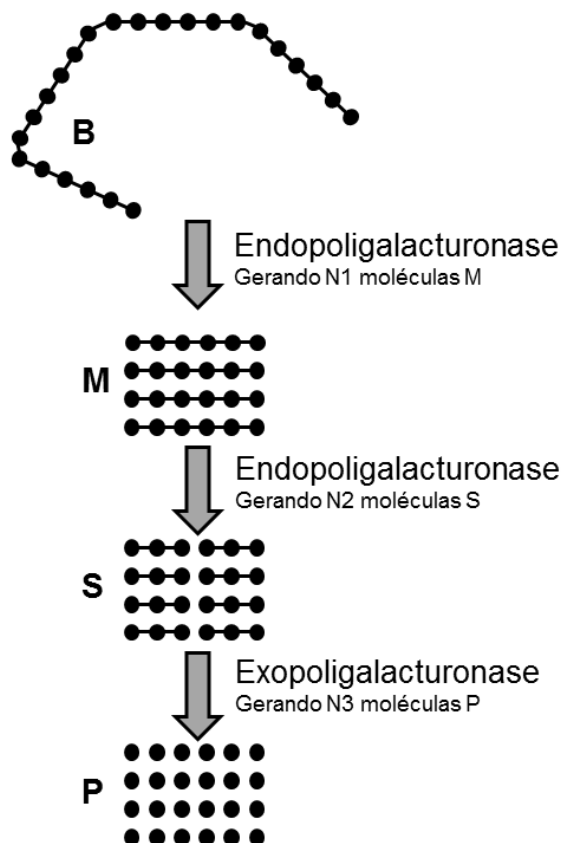


FIGURA 24 – ESQUEMA DO MODELO MATEMÁTICO PROPOSTO.

Neste modelo, o ataque de cada enzima no substrato é tratado como se fosse processivo. Em outras palavras, cada enzima, ao encontrar seu substrato, catalisa diversas reações de uma só vez, sem desligar dos substratos intermediários gerados. Como consequência, as reações podem ser representadas pelas seguintes equações estequiométricas:



O tratamento do processo como passando por somente dois oligômeros intermediários ( $M$  e  $S$ ) simplifica muito as equações cinéticas. As equações cinéticas seguem a forma da equação de Michaelis-Menten, contendo os

termos apropriados de inibição competitiva. Desta maneira, o balanço para o polímero (ou seja, para as “moléculas grandes”) fica:

$$\frac{d[B]}{dt} = - \frac{V_{max1} [B]}{K_{MB} \left(1 + \frac{[M]}{K_{MM}}\right) + [B]} \quad (4)$$

onde  $V_{max1}$  é a velocidade máxima de degradação das moléculas grandes na reação catalisada pela endopoligalacturonase,  $E_1$ ,  $[B]$  é a concentração de moléculas grandes,  $[M]$  é a concentração de moléculas de tamanho intermediário,  $K_{MB}$  é a constante de dissociação das moléculas grandes da endopoligalacturonase e  $K_{MM}$  é a constante de dissociação dos oligômeros de tamanho intermediário da endopoligalacturonase. O termo que multiplica  $K_{MB}$  no denominador representa a inibição competitiva pelo outro substrato das endoenzimas, os oligômeros de tamanho intermediário.

O balanço para as moléculas de tamanho intermediário é:

$$\frac{d[M]}{dt} = N1 \frac{V_{max1} [B]}{K_{MB} \left(1 + \frac{[M]}{K_{MM}}\right) + [B]} - \frac{V_{max2} [M]}{K_{MM} \left(1 + \frac{[B]}{K_{MB}}\right) + [M]} \quad (5)$$

onde  $N1$  é o número de oligômeros de tamanho intermediário gerados durante cada ciclo catalítico e  $V_{max2}$  é a velocidade máxima de degradação da molécula de oligômeros de tamanho intermediário na reação catalisada pela endopoligalacturonase,  $E_1$ . O termo que multiplica  $K_{MM}$  no denominador do segundo termo na direita da equação representa a inibição competitiva pelo outro substrato das endoenzimas, as moléculas de tamanho grande.

O balanço para os oligômeros pequenos fica:

$$\frac{d[S]}{dt} = N2 \frac{V_{max2} [M]}{K_{MM} \left(1 + \frac{[B]}{K_{MB}}\right) + [M]} - \frac{V_{max3} [S]}{K_{MS} \left(1 + \frac{[P]}{K_{MP}}\right) + [S]} \quad (6)$$

onde  $N2$  é o número de oligômeros pequenos gerados por ciclo catalítico,  $V_{max3}$  é a velocidade máxima de degradação dos oligômeros pequenos

catalisada pela exopoligalacturonase  $E_2$ ,  $[S]$  é a concentração de oligômeros de tamanho pequeno,  $[P]$  é a concentração de ácido D-galacturônico,  $K_{MS}$  é a constante de dissociação dos oligômeros pequenos da exopoligalacturonase e  $K_{MP}$  é a constante de dissociação do ácido D-galacturônico. O termo que multiplica  $K_{MS}$  no denominador do segundo termo na direita da equação representa a inibição competitiva pelo ácido D-galacturônico.

O balanço para o ácido D-galacturônico liberado fica:

$$\frac{d[P]}{dt} = N3 \frac{V_{max3} [S]}{K_{MS} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{MP}} \right) + [S]} \quad (7)$$

onde  $N3$  é o número de monômeros gerados por ciclo catalítico.

A velocidade de variação na concentração de pontas redutoras é igual a:

$$\frac{d[R]}{dt} = (N1 - 1) \frac{d[B]}{dt} + (N2 - 1) \frac{d[M]}{dt} + (N3 - 1) \frac{d[S]}{dt} \quad (8)$$

Os termos “ $N_x-1$ ” ocorrem porque cada reação consome 1 molécula com uma ponta redutora para produzir  $N_x$  novas moléculas com pontas redutoras.

Os valores dos parâmetros utilizados, mostrados na Tabela 5, foram escolhidos de tal maneira que algumas características dos perfis previstas fossem semelhantes aos resultados experimentais obtidos com ácido poligalacturônico: a concentração de ácido D-galacturônico em 10 min fosse próxima de  $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , a concentração de pontas redutoras em 20 min fosse próxima de  $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , a desaceleração inicial na velocidade de reação ocorresse próximo a 5 min e ocorresse uma desaceleração constante até o fim da simulação. Com os valores da Tabela 5, o modelo prevê perfis de reação, mostrados na Figura 25, semelhantes aos perfis experimentais mostrados na Figura 26, que é uma reprodução do perfil de degradação do ácido poligalacturônico mostrado no item 5.2.1.

TABELA 5 - VALORES AJUSTADOS AOS PARÂMETROS DO MODELO DESENVOLVIDO

Parâmetros	Valores ajustados ao modelo
$V_{max1}$ (mmol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,6
$V_{max2}$ (mmol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,1
$V_{max3}$ (mmol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,02
$K_{MB}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1
$K_{MM}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	1
$K_{MS}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1
$K_{MP}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1
$[B]_{inicial}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,25

Fonte: O Autor (2013).

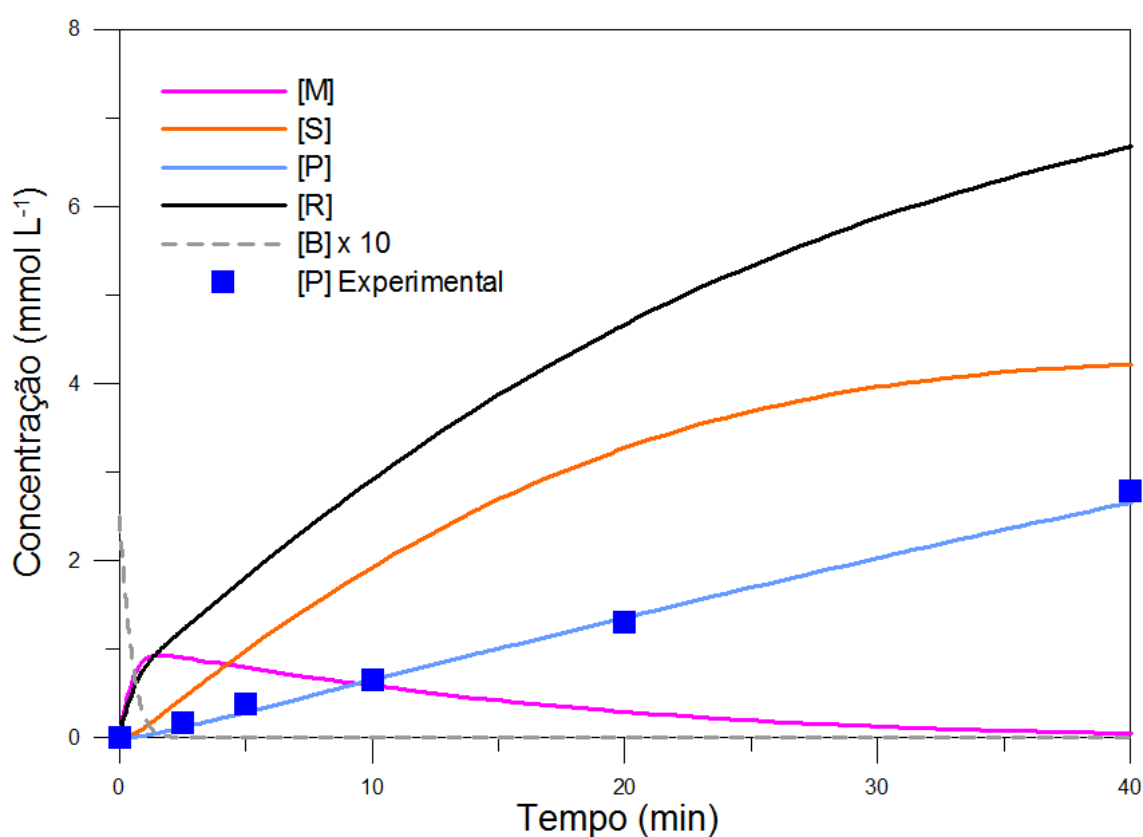


FIGURA 25 – PERFIS PREVISTOS PELO MODELO PARA A HIDRÓLISE DE ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO.

Estão representadas as concentrações ao longo do tempo dos oligômeros de tamanho intermediário ([M]), dos oligômeros pequenos ([S]), do ácido D-galacturônico ([P]), das pontas redutoras ([R]), 10× a concentração do polímero de ácido poligalacturônico ([B]) e a concentração real de ácido D-galacturônico obtida a partir da degradação do ácido poligalacturônico pelo complexo N, a 30°C e em pH 4,5.

Fonte: O Autor (2013).

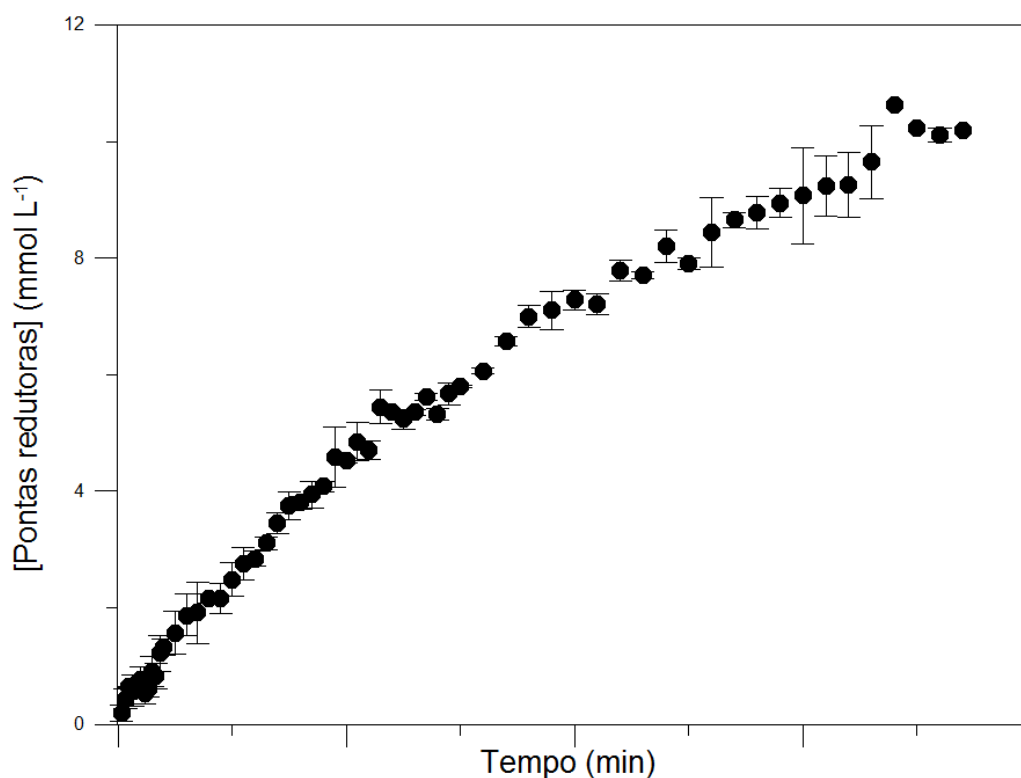


FIGURA 26 - PERFIL EXPERIMENTAL DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO.

Perfil de liberação de pontas redutoras, já mostrado no item 5.2.1, para a degradação do ácido poligalacturônico pelo complexo N.

Fonte: O Autor (2013).

Este modelo, apesar de ser simples, reforça a hipótese que foi levantada na seção 2.4, na forma de um modelo descritivo, sobre o modo de ação do complexo pectinolítico e a causa de desaceleração inicial na velocidade de reação.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo confirmou a presença de uma desaceleração inicial na velocidade de degradação de substratos pécticos por complexos de pectinases, um fenômeno que foi identificado originalmente por Biz *et al.* (2013), na utilização de extratos enzimáticos provenientes da cultura de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* (CH4). Também, no presente estudo, foi observada uma segunda desaceleração, menos pronunciada, mas contínua ao longo da reação, que está relacionada com a lentidão do processo apontada por diversos autores (BACIU e JÖRDENING, 2004; BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2007; KHAMSEH e MICCIO, 2011). Em outras palavras, no presente trabalho, a presença de duas etapas distintas de desaceleração foi reconhecida pela primeira vez.

A contribuição mais importante deste estudo é a proposta de uma explicação para as duas etapas de desaceleração. A hipótese levantada neste trabalho é que a desaceleração inicial na velocidade de reação ocorre por conta da diminuição de substrato preferencial das endoenzimas, os polímeros grandes, enquanto a desaceleração prolongada na segunda etapa e deve a uma menor eficiência catalítica das exoenzimas, que sofrem de inibição pelo produto e necessitam de enzimas auxiliares.

Conforme esta hipótese, o fenômeno de inibição pelo produto, apontado muitas vezes como o grande problema na sacarificação da pectina, não causa a desaceleração inicial, mas pode contribuir para a desaceleração prolongada que ocorre depois.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mesmo que este trabalho tenha contribuído para a compreensão da sinergia entre as enzimas na degradação de substratos pécticos pelo complexo de pectinases, ainda faltam pontos a serem investigados, como:

- A identificação e quantificação dos oligômeros gerados ao longo da reação e dos recalcitrantes, resultantes após 24 h de reação;
- A purificação e caracterização das enzimas presentes nos complexos enzimáticos, para determinar seu modo de ação em relação aos substratos;
- A realização de pré-tratamentos na pectina e no ácido poligalacturônico para retirar esterificações e cadeias laterais antes de se realizar a degradação enzimática;
- O aprimoramento do modelo desenvolvido, ou desenvolvimento de um modelo que não seja baseado em equações diferenciais, mas que leve em conta a ação de mais enzimas envolvidas no processo;
- O desenvolvimento de um método eficiente para a recuperação e purificação dos monômeros e oligômeros gerados pela degradação das diferentes fontes de pectina.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 5, p. 1215–22, 2007.

ALAM, M. N. H. Z.; PINELO, M.; SAMANTA, K.; et al. A continuous membrane microbioreactor system for development of integrated pectin modification and separation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 167, n. 2-3, p. 418–426, 2011.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21–28, 1998.

ANDERSEN, M. R.; GIESE, M.; DE VRIES, R. P.; NIELSEN, J. Mapping the polysaccharide degradation potential of *Aspergillus niger*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 313, 2012.

ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Action pattern of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards pectin fragments: Comprehension and prediction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1749, n. 1, p. 53–64, 2005.

ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Endopolygalacturonases reveal molecular features for processivity pattern and tolerance towards acetylated pectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 1, p. 5–13, 2009.

BACIU, I.-E.; JÖRDENING, H.-J. Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 505–512, 2004.

BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 833–48, 2009.

BANSAL, P.; VOWELL, B. J.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and



reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 243–50, 2012.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; ESZTERLE, M.; KISS, K.; NEMESTÓTHY, N.; GUBICZA, L. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 2, p. 438–442, 2007.

BENEN, J. A.; KESTER, H. C.; VISSER, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 259, n. 3, p. 577–85, 1999.

BENOIT, I.; COUTINHO, P. M.; SCHOLS, H. A; et al. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, v. 13, p. 321, 2012.

BIZ, A.; FARIAS, C., F.; MOTTER, F., A.; de PAULA, D., H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D., A. **Artigo em preparação**, 2013.

BLAKE J.D.; RICHARDS G.N. Problems of lactonization in the analysis of uronic acid. **Carbohydrate Research**, v. 28, p. 275-281, 1968

BOLUDA-AGUILAR, M.; GARCÍA-VIDAL, L.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, F. D. P.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3506–13, 2010.

BOLUDA-AGUILAR, M.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 188–197, 2013.

BOMMARIUS, A. S.; KATONA, A.; CHEBEN, S. E.; PATEL, A. S.; RAGAUSKAS, A. J.; KNUDSON, K.; PU, Y. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 370–81, 2008.

BONNIN, E.; LE GOFF, A.; VAN ALEBEEK, G.-J. W. M.; VORAGEN, A. G. J.; THIBAULT, J.-F. Mode of action of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards acetylated pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 381–388, 2003.

BONNIN, E.; LE GOFF, A.; KÖRNER, R.; et al. Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1526, n. 3, p. 301–9, 2001.

BONNIN, E.; LE GOFF, A.; KÖRNER, R.; et al. Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1596, n. 1, p. 83–94, 2002.

BRACCINI, I.; GRASSO, R. P.; PÉREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. **Carbohydrate Research**, v. 317, n. 1-4, p. 119–30, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRANDAM, C.; MEYER, X. M.; PROTH, J.; STREHAIANO, P.; PINGAUD, H. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 43–52, 2003.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–900, 2009.

COENEN, G. J.; BAKX, E. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 224–235, 2007.

CRUYS-BAGGER, N.; ELMERDAHL, J.; PRAESTGAARD, E.. Pre-steady-state kinetics for hydrolysis of insoluble cellulose by cellobiohydrolase Cel7A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18451–8, 2012.

EDWARDS, M. C.; DORAN-PETERSON, J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 565–75, 2012.

FAOSTAT - BASE DE DADOS ESTATÍSTICOS DE ALIMENTOS E AGRICULTURA DA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Ranking de produção de *commodities* por país, 2011.

GADRE, R. V; VAN DRIESSE, G.; VAN BEEUMEN, J.; BHAT, M. K. Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 321–330, 2003.

GROHMANN, K.; BALDWIN, E. A; BUSLIG, B. S. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 315–27, 1994.

GROHMANN, K.; BALDWIN, E. A. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 12, p. 1169–1174, 1992.

GROHMANN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 129–141, 1995.

HOLCK, J.; HJERNØ, K.; LORENTZEN, A.; et al. Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after in vitro fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1039–1049, 2011.

IGARASHI, K.; UCHIHASHI, T.; KOIVULA, A.; WADA, M.; KIMURA, S.; OKAMOTO, T.; SAMEJIMA, M. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1279–82, 2011.

JALAK, J.; KURASHIN, M.; TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 28802–28815, 2012.

JALAK, J.; VÄLJAMÄE, P. Mechanism of initial rapid rate retardation in cellobiohydrolase catalyzed cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 6, p. 871–83, 2010.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

HALL, M.; BANSAL, P.; LEE, J. H.; REALFF, M. J.; BOMMARIUS, A. S. Cellulose crystallinity-a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 6, p. 1571–82, 2010.

KESTER, H.C.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M.A.; MÜLLER, Y.; VISSER, J. Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 240, n. 3, p. 738–46, 1996.

KHAMSEH, A. A. G.; MICCIO, M. Comparison of batch, fed-batch and continuous well-mixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes. **Process Biochemistry**, 2011.

KOLJONEN, T.; HÄMÄLÄINEN, J. J.; SJÖHOLM, K.; PIETILÄ, K. A Model for the Prediction of Fermentable Sugar Concentrations During Mashing. **Journal of Food Engineering**, v. 26, p. 329–350, 1995.

KURASIN, M.; VÄLJAMÄE, P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 169–77, 2011.

LAPUERTA, M.; HERNÁNDEZ, J. J.; PAZO, A.; LÓPEZ, J. Gasification and co-gasification of biomass wastes: Effect of the biomass origin and the gasifier operating conditions. **Fuel Processing Technology**, v. 89, n. 9, p. 828–837, 2008.

LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; et al. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, p. 321–32, 2000.

LINERS, F.; THIBAUT, J. F.; VAN CUTSEM, P. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. **Plant Physiology**, v. 99, n. 3, p. 1099–104, 1992.

LOHRASBI, M.; POURBAFRANI, M.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, MOHAMMAD J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7382–7388, 2010.

LÓPEZ, J. A. S.; LI, Q.; THOMPSON, I. P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 63–69, 2010.

MA, E.; CERVERA, Q.; SÁNCHEZ, G. M. M. Integrated utilization of orange peel. **Bioresource Technology**, v. 44, p. 61–63, 1993.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2373–2383, 2008.

MASSA, C.; CLAUSEN, M. H.; STOJAN, J.; LAMBA, D.; CAMPA, C. Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia*. **The Biochemical Journal**, v. 407, n. 2, p. 207–17, 2007.

MAY, C. D. Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 79–99, 1990.

MERTENS, J. Kinetic properties of two *Rhizopus* exo-polygalacturonase enzymes hydrolyzing galacturonic acid oligomers using isothermal titration calorimetry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 2009 – 20, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426 – 428, 1959.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–77, 2008.

MOJZITA, D.; WIEBE, M.; HILDITCH, S.; et al. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169–75, 2010.

MURPHY, L.; CRUYS-BAGGER, N.; DAMGAARD, H. D.; et al. Origin of initial burst in activity for *Trichoderma reesei* endo-glucanases hydrolyzing insoluble cellulose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1252–60, 2012.

NAKAMURA, A.; FURUTA, H.; MAEDA, H.; TAKAO, T.; NAGAMATSU, Y. Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 6, p. 1301–13, 2002.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), **Integrated Biorefinery Research Facility: Partnering with Industry to Advance Biofuels and Bioproducts**, NREL Report No. FS-5100-53429, 2011.

O'NEILL, M. A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 109–39, 2004.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MADL, R. L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J. P. Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3422–9, 2010.

OLANO-MARTIN, E.; GIBSON, G. R.; RASTELL, R. A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 505–511, 2002.

OLMOS, J. C.; HANSEN, M. E. Z. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates. **Chemical Engineering Journal**, v. 192, p. 29–36, 2012.

PAGES, S.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J.; BENEN, J. A. E. Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33652–33656, 2001.

PARENICOVÁ, L.; BENEN, J. A.; KESTER, H. C.; VISSER, J. pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 251, n. 1-2, p. 72–80, 1998.

PARENICOVA, L.; BENEN, J. A.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 345, p. 637–644, 2000.

PARENICOVÁ, L.; KESTER, H. C.; BENEN, J. A.; VISSER, J. Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. **FEBS Letters**, v. 467, n. 2-3, p. 333–6, 2000.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2009.

PIJNING, T.; van POUDEROYEN, G.; KLUSKENS, L.; van der OOST, J.; DIJKSTRA, B.W. The crystal structure of a hyperthermoactive exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. **FEBS Letters**, v. 583, n. 22, p. 3665–70, 2009.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4246–50, 2010.

PRAESTGAARD, E.; ELMERDAHL, J.; MURPHY, L.; et al. A kinetic model for the burst phase of processive cellulases. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 9, p. 1547–60, 2011.

PRESEČKI, A. V.; BLAŽEVIĆ, Z. F.; VASIĆ-RAČKI, D. Complete starch hydrolysis by the synergistic action of amylase and glucoamylase: impact of calcium ions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1555–62, 2013.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 2, p. 145–152, 2005.

REVISTA RURAL. **Mercado - Laranja quer aumentar consumo doméstico**, 2000. Disponível em:  
<[http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2000/Artigos/rev33\\_mercado.htm](http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2000/Artigos/rev33_mercado.htm)>.  
Acesso em 08/09/2012.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597–604, 2009.

RIDLEY, B. L.; NEILL, M. A. O.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929–967, 2001.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–95, 2008.

SIGMA-ALDRICH – Especificação de produto: Pectina da casca de laranja. CAS Number 9000-69-5.

SIGMA-ALDRICH – Especificação de produto: Ácido poligalacturônico. CAS Number 25990-10-7.

SINGH, O. V; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 713–22, 2007.

STAUNSTRUP, J. **Citrus pectin production and world market**. International Citrus & Beverage Conference. September 15-18, 2009. Disponível em <<http://conference.ifas.ufl.edu/citrus09/htms09/agenda.html>>. Acesso em: 20/07/2012.

TALEBNIA, F.; POURBAFRANI, M.; LUNDIN, M.; TAHERZADEH, M. J. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute-acid hydrolysis. **BioResources**, v. 3, n. 1, p. 108–122, 2008.

TRIPODO, M.; LANUZZA, F.; MICALI, G.; COPPOLINO, R.; NUCITA, F. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 111–115, 2004.

VÄLJAMÄE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Mechanism of substrate inhibition in cellulose synergistic degradation. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 16, p. 4520–6, 2001.

VÄLJAMÄE, P.; SILD, V.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 253, n. 2, p. 469–475, 1998.



VINCKEN, J.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; et al. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I . Implications for Cell Wall Architecture 1. **Plant Physiology**, v. 132, n. August, p. 1781–1789, 2003.

DE VRIES, J. A.; VORAGEN, A. G. J.; ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Extraction and Purification of Pectins from Alcohol. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, p. 117–127, 1981.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I** – Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), National Renewable Energy Laboratory (NREL), Office of Biomass Program (EERE), 2004.

WILKINS, M. R.; SURYAWATI, L.; MANESS, N. O.; CHRZ, D. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1161–1168, 2007.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1614–1619, 2007.

WILLATS, W. G. .; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2009.

YAMAGUCHI, F.; SHIMIZU, N.; HATANAKA, C. Preparation and Physiological Effect of Low-molecular-weight Pectin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 4, p. 679–682, 1994.

YAPO, B. M.; LEROUGE, P.; THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 426–435, 2007.

ZHANG, J. **Biochemical Study and Technical Applications of Fungal Pectinase**. Uppsala:Uppsala Universitet, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.